



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ATENCIÓN Y SERVICIOS FARMACÉUTICOS

**“Caracterización de las concentraciones
plasmáticas de glutamato, taurina, arginina y
citrulina como biomarcadores de pronóstico en
pacientes con hemorragia subaracnoidea”**

**IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
FARMACÉUTICAS**

PRESENTA:

Q.F.B. CARLOS SOLIS GASPAR

COTUTOR:

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

COTUTOR:

Dr. Luis Antonio Tristán López

ASESOR:

Dr. Martín Gómez Hernández

Ciudad de México, mayo de 2018



“Caracterización de las concentraciones plasmáticas de glutamato, taurina, arginina y citrulina como biomarcadores de pronóstico en pacientes con hemorragia subaracnoidea”

COMITÉ TUTORAL

Vo. Bo.

COTUTOR

COTUTOR

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Dr. Luis Antonio Tristán López

ASESOR

Dr. Martín Gómez Hernández

ALUMNO

Q.F.B. Carlos Solis Gaspar

Matrícula: 2161800597



“Caracterización de las concentraciones plasmáticas de glutamato, taurina, arginina y citrulina como biomarcadores de pronóstico en pacientes con hemorragia subaracnoidea”

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Vo. Bo.

PRESIDENTE

Dra. Penélope Aguilera Hernández

VOCAL

SECRETARIO

Dr. Sergio Enrique Meza Toledo

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

I. RESUMEN

Se ha estimado que el 45% de los pacientes con hemorragia subaracnoidea (HSA) fallece y el 50% restante queda con algún tipo de secuela neurológica y motora que repercute en la calidad de vida del individuo. A pesar de los avances en las estrategias de diagnóstico y tratamiento, la HSA continúa siendo un problema de salud pública que requiere de nuevos sistemas de evaluación y seguimiento en los pacientes. Una alternativa de diagnóstico utilizada hoy en día en el área clínica para establecer la presencia y progresión de una enfermedad, son los biomarcadores. La caracterización de biomarcadores asociados al daño neuronal puede proporcionar información sobre el estado de salud y evolución de los pacientes con HSA. De manera previa, se han reportado alteraciones en las concentraciones plasmáticas de algunos aminoácidos, tales como taurina, el cual se encuentra asociado con el flujo sanguíneo y el edema; arginina y citrulina, implicados en la síntesis del óxido nítrico, molécula implicada en la respuesta vascular cerebral y el glutamato, neurotransmisor implicado en funciones cognitivas y motoras, que en elevadas concentraciones conlleva a la muerte neuronal.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar como posibles biomarcadores de pronóstico las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos glutamato, taurina, arginina, citrulina y nitratos/nitritos (NO_x) en pacientes con HSA que fueron ingresados al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” durante el período de enero a junio de 2017. La determinación de aminoácidos en plasma se realizó mediante CLAR-DFL, método analítico validado de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013 y la cuantificación de nitratos/nitritos se realizó mediante espectrometría UV/vis.

El método desarrollado para la cuantificación simultánea de aminoácidos fue lineal, selectivo, preciso, exacto y estable en las condiciones de trabajo evaluadas. En la comparación de la concentración plasmática de aminoácidos entre pacientes con HSA y sujetos sanos, se observó un aumento en el nivel de glutamato y la disminución de arginina, citrulina, el cociente glutamina/glutamato, así como en el

nivel de NOx respectivamente, mientras que en glutamina y taurina no se observaron diferencias significativas. Al realizar el análisis de correlación entre los niveles plasmáticos de aminoácidos y NOx con las escalas de evaluación clínica Fisher, Hunt & Hess, coma Glasgow y desenlace Glasgow, no se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas. Por lo tanto, los analitos no mostraron potencial para ser considerados como biomarcadores de pronóstico. Sin embargo, en el análisis de aminoácidos y NOx de acuerdo con el estado de consciencia evaluado con la escala de coma Glasgow tanto al momento del ingreso hospitalario como a los 8 meses después de su egreso en pacientes con HSA y sujetos sanos, se observó que los aminoácidos glutamato, arginina, citrulina, Gln/Glu y NOx se encuentran implicados con la condición clínica inicial de los pacientes, reflejando un posible potencial como biomarcadores iniciales de daño en la HSA.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca con número de registro 745859, con la cual pude realizar mis estudios de maestría durante el período enero de 2016 a diciembre de 2017.

Al proyecto CONACyT No. 261721 titulado “Determinación de los niveles plasmáticos de taurina, glutamina, arginina y citrulina como biomarcadores de pronóstico en pacientes pediátricos con edema cerebral derivado de traumatismo craneoencefálico” por el aporte de insumos cromatográficos para llevar a cabo el proyecto.

Al proyecto CONACyT “Fronteras de la ciencia” 2015-1 con número de clave 788.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco por brindarme la oportunidad de ser parte de tan distinguida y apreciable institución.

A la Maestría en Ciencias Farmacéuticas y sobre todo al panel de profesores, gracias por sus grandes enseñanzas tanto académicas como personales, así como su guía y aprendizaje.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) “Manuel Velasco Suárez”, especialmente al laboratorio de Neuroquímica y al departamento de Terapia Endovascular con quien se colaboró para poder desarrollar este proyecto, gracias por los recursos y la oportunidad brindada.

*El presente trabajo está dedicado a Dios por guiarme en este tormentoso y gustoso camino del posgrado, así como a mis padres **Juan Solis Rojas** y **Antonia Gaspar Ramírez**, gracias por su inconmensurable amor, cariño y apoyo en todo momento, en especial a ustedes dedico este trabajo.*

*A mis hermanos **Alejandro**, **Emma** y **Marina**, que siempre me han ayudado de mil maneras, a ustedes y a su apreciable familia (pareja e hijos), les corresponde un fragmento de esta meta.*

A todos ustedes dedico este trabajo, los amo mucho, familia.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda**, jefe del laboratorio de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y docente de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, por la confianza de permitirme participar en este proyecto, además de contribuir en su realización y revisión del mismo.

Al **Dr. Martín Gómez Hernández** como parte de mi comité tutorial por su valiosa orientación y apoyo en la realización de este proyecto.

Al **Dr. Luis Antonio Tristán López**, un gran mentor y amigo, le agradezco su confianza, ayuda, paciencia y orientación en todo momento en la realización de este proyecto, ya si su ayuda esto no se podría haber logrado.

A los miembros de la comisión revisora, la **Dra. Penélope Aguilera Hernández** y el **Dr. Sergio Enrique Meza Toledo**, por sus comentarios y sugerencias en la revisión de este proyecto.

A los miembros del laboratorio de Neuroquímica del INNN, por su gran atención a mi persona, especialmente a las Dras. **Sonia Galván** y **Laura Osorio**, quienes hicieron una estancia agradable.

A mis **amigos del posgrado** (ya saben quiénes son ja ja ja), con quienes compartí grandes momentos y experiencias a su lado, ustedes para mi son valiosas personas, espero seguir viéndolos y estar en contacto con ustedes, a ustedes ¡salud!

A mis amigos de toda la vida, y a quiénes me encontré nuevamente aquí en la ciudad, aquellos sonsacadores (**Elena** y **Javier**).

ÍNDICE

I.	Resumen	iv
	○ Abreviaturas	xi
	○ Índice de figuras	xii
	○ Índice de tablas	xiii
II.	Introducción	14
III.	Antecedentes	15
IV.	Marco teórico	16
	4.1 Hemorragia subaracnoidea	16
	4.1.1 Epidemiología	16
	4.1.2 Etiología	17
	4.1.3 Escalas de evaluación	18
	4.1.4 Importancia de un seguimiento oportuno	20
	4.2 Biomarcadores	20
	4.2.1 Tipos de biomarcadores	21
	4.2.2 Validez de un biomarcador	21
	4.2.3 Biomarcadores de hemorragia subaracnoidea	22
	4.2.4 Aminoácidos como biomarcadores de hemorragia subaracnoidea	23
	4.2.4.1 Glutamato	23
	4.2.4.2 Taurina	24
	4.2.4.3 Arginina y citrulina	25
	4.2.4 Cuantificación de aminoácidos en muestras biológicas	26
	4.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de aminoácidos	26
	4.3.1 Detectores	27
	4.3.2 Detector de fluorescencia	28
	4.4 Validación de un método analítico cromatográfico	28
V.	Planteamiento del problema	29
VI.	Justificación	29
VII.	Hipótesis	30
VIII.	Objetivos	30
	8.1 General	30
	8.2 Específicos	30
IX.	Metodología	32
	9.1 Reactivo y equipo utilizado	32
	9.1.2 Reactivos	32
	9.1.3 Sustancias de referencia	32
	9.1.4 Equipos e instrumentos	32

9.2 Validación del método analítico por CLAR-DFL	33
9.2.1 Preparación de soluciones	33
9.2.2 Preparación de soluciones stock	34
9.2.3 Condiciones cromatográficas	34
9.2.4 Condiciones del detector	35
9.2.5 Preparación de curvas de calibración y puntos control	35
9.2.6 Procesamiento de la muestra	36
9.2.7 Preparación de los parámetros de validación	37
9.3 Determinación de la concentración plasmática de aminoácidos	39
9.3.1 Diseño del estudio	39
9.3.2 Población y muestra	39
9.3.3 Criterios de selección del estudio	40
9.3.3.1 Criterios de inclusión	40
9.3.3.2 Criterios de exclusión	41
9.3.4 Toma y tratamiento de la muestra	41
9.3.5 Aplicación de la escala de desenlace Glasgow	42
9.4 Cuantificación plasmática de nitratos y nitritos (NOx)	42
9.4.1 Preparación de soluciones	42
9.4.2 Preparación de la solución stock	43
9.4.3 Cuantificación de NOx por espectrofotometría UV/vis	44
9.5 Análisis estadístico	44
X. Resultados	45
10.1 Validación analítica CLAR-DFL	45
10.1.1 Selectividad	45
10.1.2 Linealidad en plasma	46
10.1.3 Límite inferior de cuantificación	48
10.1.4 Evaluación de precisión y exactitud en las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad	48
10.1.4.1 Precisión en la prueba de repetibilidad	48
10.1.4.2 Exactitud en la prueba de repetibilidad	49
10.1.4.3 Precisión en la prueba de reproducibilidad	50
10.1.4.4 Exactitud en la prueba de reproducibilidad	50
10.1.5 Estabilidad	51
10.1.5.1 Estabilidad en automuestreador	51
10.1.5.2 Estabilidad a largo plazo	52
10.2 Cuantificación plasmática de aminoácidos	52
10.2.1 Características clínicas de los pacientes	52
10.2.2 Niveles plasmáticos de aminoácidos	53
10.2.2.1 Glutamato	53

10.2.2.2	Glutamina	54
10.2.2.3	Cociente glutamina/glutamato	55
10.2.2.4	Taurina	55
10.2.2.5	Arginina	56
10.2.2.6	Citrulina	57
10.3	Cuantificación plasmática de NOx	57
10.4	Caracterización de aminoácidos como posibles biomarcadores	58
10.4.1	Estudio de correlación	58
10.4.2	Niveles plasmáticos de aminoácidos y su relación con el estado de consciencia inicial	59
10.4.2.1	Glutamato	59
10.4.2.1	Glutamina	60
10.4.2.3	Cociente glutamina/glutamato	60
10.4.2.4	Taurina	61
10.4.2.5	Arginina	62
10.4.2.6	Citrulina	62
10.4.2.7	Nitratos/nitritos (NOx)	63
10.4.3	Niveles plasmáticos de aminoácidos y su relación con el estado de consciencia 8 meses después del egreso hospitalario	64
10.4.3.1	Glutamato	64
10.4.3.1	Glutamina	65
10.4.3.3	Cociente glutamina/glutamato	65
10.4.3.4	Taurina	66
10.4.3.5	Arginina	66
10.4.3.6	Citrulina	67
10.4.3.7	Nitratos/nitritos (NOx)	68
XI.	Discusión de resultados	69
11.1	Validación del método cromatográfico para la cuantificación de aminoácidos	69
11.2	Determinación de aminoácidos en plasma	72
XII.	Conclusiones	80
XIII.	Perspectivas	81
XIV.	Bibliografía	82
XV.	Anexos	88

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

HSA	Hemorragia subaracnoidea	OPA	Orto-ftalaldehído
EVC	Enfermedad vascular cerebral	%	Por ciento
EDT	Ecografía de Doppler Transcraneal	<	Menor que
IL-1	Interleucina-1	>	Mayor que
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α	\pm	Más, menos
PCR	Proteína C reactiva	g	Gramos
PQM-1	Proteína quimioatrayente monocitaria	μL	Microlitros
LCR	Líquido cefalorraquídeo	CV	Coefficiente de variación
NO	Óxido nítrico	LIC	Límite inferior de cuantificación
NOs	Óxido nítrico sintasa	MCB	Muestra control bajo
NOe	Óxido nítrico endotelial	MCM	Muestra control medio
NO_n	Óxido nítrico neuronal	MCA	Muestra control alto
NO_i	Óxido nítrico inducible	mM	Milimolar
NMDA	N-metil-D-aspartato	μM	Micromolar
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolpropiónico	NOM	Norma Oficial Mexicana
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución	OMS	Organización Mundial de la Salud
CLAR-DFL	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia	PCR	Proteína C reactiva

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1	Esquema de la hemorragia subaracnoidea	16
Figura 2	Estructura de los aminoácidos glutamato y glutamina	24
Figura 3	Estructura del aminoácido taurina	25
Figura 4	Estructura de los aminoácidos arginina y citrulina	26
Figura 5	Cromatograma de aminoácidos en solución acuosa	45
Figura 6	Cromatograma de aminoácidos en plasma	45
Figura 7	Curvas de calibración para cada aminoácido	46
Figura 8	Concentración plasmática de glutamato	54
Figura 9	Concentración plasmática de glutamina	54
Figura 10	Concentración plasmática del cociente glutamina/glutamato	55
Figura 11	Concentración plasmática de taurina	56
Figura 12	Concentración plasmática de arginina	56
Figura 13	Concentración plasmática de citrulina	57
Figura 14	Concentración plasmática de NOx	57
Figura 15	Concentración plasmática de glutamato de acuerdo con el estado de consciencia inicial	59
Figura 16	Concentración plasmática de glutamina de acuerdo con el estado de consciencia inicial	60
Figura 17	Concentración plasmática del cociente glutamina/glutamato de acuerdo con el estado de consciencia inicial	61
Figura 18	Concentración plasmática de taurina de acuerdo con el estado de consciencia inicial	61
Figura 19	Concentración plasmática de arginina de acuerdo con el estado de consciencia inicial	62
Figura 20	Concentración plasmática de citrulina de acuerdo con el estado de consciencia inicial	63
Figura 21	Concentración plasmática de NOx de acuerdo con el estado de consciencia inicial	63
Figura 22	Concentración plasmática de glutamato de acuerdo con el estado de consciencia a los 8 meses después	64
Figura 23	Concentración plasmática de glutamina de acuerdo con el estado de consciencia a los 8 meses después	65
Figura 24	Concentración plasmática del cociente glutamina/glutamato de acuerdo con el estado de consciencia a los 8 meses después	65
Figura 25	Concentración plasmática de taurina de acuerdo con el estado de consciencia a los 8 meses después	66
Figura 26	Concentración plasmática de arginina de acuerdo con el estado de consciencia a los 8 meses después	67
Figura 27	Concentración plasmática de citrulina de acuerdo con el estado de consciencia a los 8 meses después	67
Figura 28	Concentración plasmática de NOx de acuerdo con el estado de consciencia a los 8 meses después	68
Figura 29	Reacción de derivatización fluorescente de aminoácidos con OPA/2-MER	69

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Escala Hunt y Hess	18
Tabla 2	Escala de coma Glasgow	19
Tabla 3	Escala Fisher	20
Tabla 4	Preparación de soluciones stock A	34
Tabla 5	Condiciones cromatográficas	35
Tabla 6	Preparación de curva de calibración en plasma	36
Tabla 7	Preparación de puntos control en plasma	36
Tabla 8	Preparación de la curva de calibración para NOx	43
Tabla 10	Concentración recuperada y porcentaje de desviación nominal	47
Tabla 11	Repetibilidad del método	48
Tabla 12	Reproducibilidad del método	49
Tabla 13	Exactitud del método de los datos de repetibilidad	50
Tabla 14	Exactitud del método de los datos de reproducibilidad	51
Tabla 15	Estabilidad aminoácidos en automuestreador (temperatura ambiente, 24 h)	52
Tabla 16	Estabilidad aminoácidos a largo plazo (60 días, -20°C)	53
Tabla 17	Características clínicas de los pacientes con HSA	58

II. INTRODUCCIÓN

Dentro de las enfermedades vasculares cerebrales (EVC), la hemorragia subaracnoidea (HSA) representa sólo el 10% de los casos; sin embargo, se trata de la forma más temida debido a su elevada mortalidad y generación de dependencia (Owens, 2011; Barges-Coll *et al.*, 2013). Para el diagnóstico en este tipo de enfermedades se encuentran los métodos de imagen, sin embargo, es necesario el empleo de nuevos sistemas de evaluación capaces de proporcionar información sobre el estado clínico en pacientes con HSA (Luengo-Fernández *et al.*, 2012).

Una alternativa de diagnóstico y seguimiento de la HSA en el área clínica es el empleo de biomarcadores, los cuales se definen como características medibles procedentes de procesos biológicos y patológicos (Anderson & Kodukula, 2014). La identificación de biomarcadores asociados al daño neuronal puede proporcionar información sobre el estado de salud en pacientes con HSA (Mendioroz-Iriarte *et al.*, 2009).

Como propuesta de biomarcadores en esta enfermedad se encuentran algunos aminoácidos. La taurina, es un osmolito orgánico que se encuentra asociado con el edema y flujo sanguíneo (Barges-coll *et al.*, 2013), la arginina y la citrulina están implicados en la síntesis del óxido nítrico, molécula responsable de caracterizar la respuesta vascular cerebral (El-Hattab *et al.*, 2014), y el glutamato que es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central y periférico, que puede estar implicado en procesos de muerte neuronal (Liu *et al.*, 2015).

Uno de los métodos instrumentales más empleados para la cuantificación de aminoácidos es la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia (CLAR-DFL), en el que con previa derivatización de los compuestos, es posible llevar a cabo su determinación en diferentes matrices biológicas incluyendo el plasma (Perucho *et al.*, 2015).

La cuantificación de estos aminoácidos en el plasma de pacientes con HSA, así como su correlación con otros predictores como la edad, resultados de pruebas químicas de laboratorio, puntaje en las escalas de Fisher, Hunt-Hess y Glasgow, podrán permitir la caracterización de estos aminoácidos como posibles biomarcadores de pronóstico en pacientes con HSA.

III. ANTECEDENTES

La hemorragia subaracnoidea, es un subtipo de enfermedad vascular cerebral (EVC) que presenta una elevada tasa de morbilidad ocasionada principalmente por la aparición de una lesión cerebral secundaria, entre ellas se encuentra el resangrado, la presencia de vasoespasmo y el edema cerebral que generalmente acontece a los 3 y 9 días después del evento hemorrágico (Starke, *et al.*, 2011; Barges-Coll *et al.*, 2013). La presencia de estas complicaciones ocurre en un 30% a 50% de los pacientes como resultado de la aparición de procesos isquémicos, aumento de la presión intracraneal y disminución en la perfusión cerebral (Barges-Coll *et al.*, 2013).

La adopción de estrategias para el tratamiento y seguimiento de la enfermedad mediante terapia endovascular, quirúrgica y atención neurocrítica, intentan identificar el impacto que tiene la frecuencia y los factores predictivos sobre el cuidado del paciente para evitar de forma específica, la aparición de futuras complicaciones secundarias al evento hemorrágico (Naidech *et al.*, 2015). Entre los métodos que actualmente se emplean para la detección temprana de estas complicaciones se encuentra la ecografía de Doppler transcraneal (EDT), el cual se ha utilizado durante décadas como herramienta para seleccionar a los pacientes con riesgo de desarrollar vasoespasmo cerebral, pero el método es sensible a la interpretación de cada observador (Da Silva *et al.*, 2017). Por otra parte, las técnicas de imagen como TC y angiografía muchas veces no son capaces de detectar la presencia de inflamación e incluso edema cerebral después del evento hemorrágico, empleándose únicamente como métodos de diagnóstico y con poco potencial para su empleo en el seguimiento de los pacientes (Claassen *et al.*, 2001).

El conocimiento detallado de nuevos factores implicados en la fisiopatología de la enfermedad sería de gran importancia para su comprensión en la toma de decisiones para el tratamiento apropiado de pacientes con HSA.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Hemorragia subaracnoidea

La hemorragia subaracnoidea se define como la presencia o extravasación de sangre al espacio subaracnoideo (figura 1), comprendido entre la piamadre y los aracnoides (Díez-Tejedor, 2006; Cantú-Brito *et al.*, 2012). La principal forma clínica de manifestación es la cefalea, la cual es de comienzo súbito, alcanzando su acmé en segundos o en minutos. Otros síntomas que pueden presentarse son la pérdida de conciencia, náuseas, vómitos, focalidad neurológica o crisis comiciales (Vivancos *et al.*, 2014). Los principales factores de riesgo asociados a la HSA se encuentra la hipertensión, sobrepeso, tabaquismo, consumo de alcohol y drogas, e incluso existe un patrón estacional, siendo más frecuentes en primavera e invierno (Bederson *et al.*, 2009).

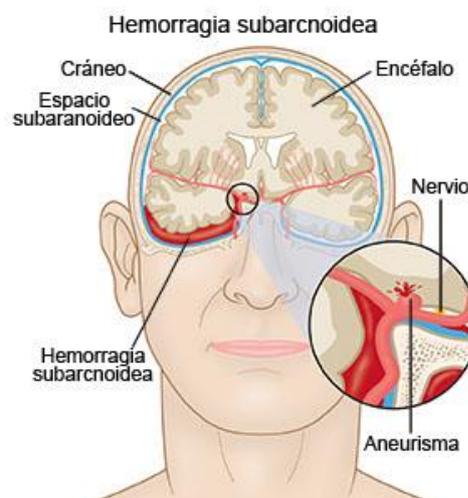


Figura 1. Representación de la hemorragia subaracnoidea. Presencia de sangrado entre surcos y cisuras del cerebro que se encuentran por fuera del parénquima cerebral pero dentro de los aracnoides (Roig, 2017).

4.1.1 Epidemiología

La HSA es considerada una emergencia neurológica debido a la elevada tasa de mortalidad y morbilidad que presenta, ya que aproximadamente el 45% de los pacientes

fallece, y dentro del porcentaje de sobrevivientes, un 20-30% padece secuelas cognitivas y físicas significativas (Cantú-Brito *et al.*, 2011). La tasa global de incidencia aproximada es de 8 por cada 100,000 personas/año (van Lieshout *et al.*, 2017), tan solo en Estados Unidos se registran de 21,000 a 33,000 casos por año (Cabrera *et al.*, 2008), con una incidencia de 9 a 14 casos por cada 100,000 habitantes (Rumalla& Mittal, 2016). En México se determinó una incidencia de casi 7% en un grupo de 669 pacientes que presentaron EVC (Cabrera *et al.*, 2008).

La edad es un factor importante para la incidencia de HSA, ya que en adultos mayores de 55 años el riesgo se duplica (Gorelick & Ruland, 2010). También se ha observado que los eventos de HSA son más frecuentes en mujeres mayores de 40 años que en hombres en una proporción 3:2, pero ocurre lo contrario en edades menores (Diringer, 2009).

4.1.2 Etiología

La HSA puede tener un origen traumático o no traumático, siendo el primero la causa más común ocasionada por la ruptura o laceración de las venas corticales que atraviesan el espacio subaracnoideo. Se estima que entre un 75% y 80% de los casos se debe al traumatismo ocasionado por la ruptura de un aneurisma cerebral, mientras que el 20% restante, a malformaciones arteriovenosas, tumores cerebrales, trastornos de la coagulación, u otras causas no identificadas (Cabrera *et al.*, 2008).

Si bien la HSA representa aproximadamente el 10% de las enfermedades cerebrovasculares, es la que tiene mayor impacto en morbilidad y mortalidad debido a la naturaleza isquémica de la lesión cerebral que se presenta tras el evento hemorrágico (Sehba *et al.*, 2012; OlivTsikández-Travieso, 2014). Los principales cambios observados son aumento de la presión intracraneal, caída del flujo sanguíneo cerebral provocado por la constricción de vasos sanguíneos durante el espasmo arterial agudo (Bedeson *et al.*, 1998) y cambios del metabolismo cerebral, los cuales incluyen alteración en la homeostasis iónica, presencia subaracnoidea de oxihemoglobina, reducción del óxido nítrico cerebral, generación de radicales libres, estrés oxidante, aumento de la actividad del receptor de glutamato y activación de diferentes mecanismos inflamatorios (Petzold *et al.*, 2008; Sehba *et al.*, 2012).

4.1.3 Escalas de evaluación

La manifestación clínica es uno de los principales factores de pronóstico en pacientes con HSA, ya que existe buena correlación entre la evolución final con el grado clínico inicial. Aunque no existe una escala perfecta, algunas de las escalas más empleadas en esta enfermedad son:

- a) **Escala Hunt y Hess (H&H).** Se trata de una escala predictora de morbilidad y mortalidad que clasifica la severidad de la enfermedad en cinco grados (tabla 1). Pacientes con grados III, IV y V tienen un porcentaje de supervivencia entre un 40-50% con importantes secuelas neurológicas como invalidez, mientras que los pacientes con grados I y II desarrollan una situación clínica de mejor pronóstico (De la Cruz, 2007; Rodríguez *et al.*, 2011).

Tabla 1. Escala predictora de morbilidad y mortalidad Hunt y Hess

Grado	Criterios
I	Asintomático, leve cefalea o rigidez de nuca.
I	Sin compromiso de consciencia, estable, pero con déficit neurológico establecido.
II	Cefalea moderada a severa, rigidez de nuca, compromiso de nervios craneales.
III	Soporoso, confuso, con déficit local leve.
IV	Sopor moderado a profundo, hemiparesia moderada a severa, esbozo de rigidez de descerebración.
V	Coma profundo, rigidez de descerebración, aspecto moribundo.

- b) **Escala de Coma Glasgow.** Esta escala se utiliza para evaluar el nivel de consciencia cuando hay algún tipo de lesión traumática (normal, grave y coma profundo). Consiste en evaluar tres criterios de observación clínica: respuesta ocular, respuesta verbal y respuesta motora (tabla 2). Además, puede ser empleada para decidir o justificar tratamientos con base a la gravedad de la lesión (Muñana-Rodríguez *et al.*, 2014; Junior *et al.*, 2017).

Tabla 2. Escala de Coma Glasgow

Respuesta ocular (Apertura de ojos)	Abre espontáneamente	4
	Abre a estímulos verbales	3
	Abre al dolor	2
	Ausencia de respuesta	1
Respuesta Motora	Obedece órdenes	6
	Localiza dolor	5
	Retirada al dolor	4
	Flexión anormal	3
	Extensión anormal	2
	No responde	1
Respuesta Verbal	Orientado, conversa	5
	Desorientado, conversa	4
	Palabras inapropiadas	3
	Sonidos Incomprensibles	2
	No responde	1
TOTAL		

PUNTUACIÓN:	
Normal	15
Moderado	4 -14
Coma profundo	3

- c) **Escala de desenlace Glasgow.** Escala empleada para evaluar la afectación de la lesión sobre la funcionalidad del paciente en la realización de diferentes actividades cotidianas. De forma general, se basa en cinco categorías ordenadas: muerte, estado vegetativo, discapacidad grave, discapacidad moderada y buena recuperación; sin embargo, las discapacidades y la recuperación se subcategorizan en inferior y superior para permitir una mayor diferenciación entre los niveles de recuperación que se puede lograr (Weir *et al.*, 2012).
- d) **Escala de Fisher.** Se basa en la cantidad y distribución de la hemorragia visualizado en la tomografía computarizada (tabla 3). Otorga un valor de 1 a 4 según la presencia de sangre a nivel intraventricular bilateral, o cisternal como indicativo de la existencia de vasoespasmo (Claassen *et al.*, 2001; Lantigua *et al.*, 2015).

Tabla 3. Escala de Fisher

Grado	Criterios
I	Sin evidencia de sangrado.
II	Sangrado difuso y fino, <1 mm en cisternas verticales.
III	Existencia de coágulo grueso cisternal >1 mm en cisternas verticales.
IV	Hematoma intraparenquimatoso, hemorragia ventricular, ± sangrado difuso.

4.1.4 Importancia de un seguimiento oportuno

Aproximadamente el 50% de los pacientes que padece HSA sobrevive, de los cuales 30% sufre déficits neurológicos que afectan su autonomía (Bornstein & Poon, 2012). Las afectaciones más importantes son a nivel físico (déficit motor, ataxia, disartria), funcional (disfunción de movilidad), mental (disminución de la cognición) y social (baja productividad laboral y social) que repercuten en la calidad de vida del paciente (Rothwell *et al.*, 2009). También se ha observado en pacientes con HSA aneurismática de bajo grado, existe la posibilidad de resangrado en un 4% durante las primeras 24 horas, la cual aumenta 1.5% por día, de manera que alcanza el 19% durante las primeras dos semanas, 64% al final del primer mes y 78% a los 60 días (Cardentey-Pereda *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2016).

Debido a estas complicaciones, la enfermedad llega a tener un costo elevado para las instituciones de salud pública, tan sólo en Europa es de hasta 35,000 euros, sin mencionar el costo humano incalculable para pacientes y familiares (Horcajadas *et al.*, 2015; Gonzales-Portillo *et al.*, 2016). En México, existen pocos espacios de atención pública para el diagnóstico y rehabilitación a pacientes con daño cerebral; sin embargo, en 2008 reportaron una tasa de 6.8% realizada en cinco instituciones hospitalarias (Cabrera *et al.*, 2008). Por lo tanto, existe la necesidad de contar con nuevas modalidades de seguimiento en pacientes con HSA.

4.2 Biomarcadores

Una alternativa de diagnóstico utilizada hoy en día en el área clínica es el empleo de biomarcadores, los cuales se definen como indicadores cuantitativamente medibles procedentes de procesos biológicos, fisiopatológicos o de respuesta terapéutica

(Pendyala *et al.*, 2009). Los biomarcadores desempeñan un papel importante en la investigación biomédica, ya que pueden emplearse como medidas de diagnóstico para establecer la presencia de una enfermedad, predecir su progresión y estratificar su gravedad. Además, se pueden utilizar para evaluar y predecir el beneficio y/o toxicidad clínica de alguna nueva intervención terapéutica en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (Anderson & Kodukula, 2014).

4.2.1 Tipos de biomarcadores

Los biomarcadores pueden ser una gran variedad de indicadores cuantificables, en las que se incluyen enzimas, proteínas, ADN, ARNm no codificante, o bien características macroscópicas tales como presión arterial, glucosa en sangre, metabolitos celulares, e incluso estudios de imagen clínica tales como tomografía computarizada, resonancia magnética, entre otras (Anderson & Kodukula, 2014). Otros biomarcadores incluyen estudios histopatológicos, los cuales llegan a ser el estándar de oro para el diagnóstico de enfermedades; sin embargo, su aplicación es muy limitada o imposible de realizar (Lock & Bonventre, 2008).

La localización de estos biomarcadores es variada, ya que pueden obtenerse a partir de diferentes matrices biológicas tales como plasma, orina, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo, entre otros, los cuales pueden ser más fácil de obtener en comparación con el tejido (Mendioroz-Iriarte *et al.*, 2009).

4.2.2 Validez de un biomarcador

Antes de la aplicación de un marcador biológico, éste necesita estar previamente validado (Dancey *et al.*, 2010). El proceso de selección y aprobación de un biomarcador requiere de especificidad, fiabilidad, sensibilidad y garantía del procedimiento analítico e interpretación de la medición (Arango, 2011). La heterogeneidad de la enfermedad también es determinante para establecer si un único analito es suficiente, o si se requiere de un panel de ellos, ya que la presencia de factores tanto individuales como ambientales en los pacientes puede dificultar su aprobación (Anderson & Kodukula, 2014).

Una vez identificado él o los analitos con potencial de biomarcador, el posterior desarrollo implica su cuidadosa aplicación en ensayos clínicos, en los que, de ser posible, se incluya la comparación con el estándar existente, con el objetivo de determinar si el biomarcador alcanza su propósito en un entorno clínico cuidadosamente definido y en la población de interés estudiada (Puntmann, 2009). La finalidad de estos ensayos clínicos es obtener información relevante en la población de estudio, evidenciar que la muestra es medible dentro de esta población, considerar la posible existencia de riesgo en la obtención de la muestra y finalmente, demostrar que la información obtenida contribuirá al conocimiento científico (Dancey *et al.*, 2010).

4.2.3 Biomarcadores de hemorragia subaracnoidea

Existe evidencia de que algunos fenómenos inflamatorios juegan un papel importante en la fisiopatología de la HSA y, por lo tanto, pueden ser empleados con fines de diagnóstico e incluso de pronóstico. Las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral TNF α orquestan una cascada inflamatoria que exacerba el daño cerebral isquémico (Mendioroz-Iriarte *et al.*, 2009). Se ha observado que pacientes con HSA, el nivel de citocinas en suero y LCR aumenta en los primeros tres días del evento hemorrágico, los cuales están asociados con espasmo vascular y desenlace clínico desfavorable (Dumont *et al.*, 2003; Jedrzejowska-Szypulka *et al.*, 2009). La proteína C reactiva (PCR) es otro marcador sensible de inflamación sistémica que se emplea como predictor durante la fase aguda de la enfermedad (Rallidis *et al.*, 2006). En pacientes con HSA los niveles de PCR aumentan en los próximos 2-3 días, los cuales correlacionan con bajas puntuaciones en la escala de desenlace Glasgow y elevados grados de Hunt & Hess y Fisher (Fountas *et al.*, 2009; Sehba *et al.*, 2012). La IL-8 y la PQM-1 (proteína quimioatrayente monocitaria) están relacionados con el reclutamiento de neutrófilos y monocitos/macrófagos respectivamente en la zona de isquemia cerebral; sin embargo, sus concentraciones son mayores en LCR que en plasma (Kostulas *et al.*, 1999).

La homocisteína es un aminoácido sintetizado a partir de metionina, en el que se ha reportado que su presencia en niveles elevados induce daño oxidativo a las células endoteliales vasculares, reduciendo la producción de óxido nítrico (Jung *et al.*, 2013),

incluso se ha observado que en población asiática elevados niveles de este aminoácido se relacionan con un peor pronóstico de desenlace para una EVC (Zhong *et al.*, 2014).

Actualmente, se emplean técnicas de biología molecular para la identificación de biomarcadores a nivel genómico de proteínas (proteómica), metabolitos y enzimas (metabolómica); sin embargo, sus relaciones estadísticas entre expresión génica y niveles de proteínas o metabolitos pueden ser inconsistentes debido a la cantidad de información obtenida en el análisis (Barallobre-Barreiro *et al.*, 2013; Qureshi *et al.*, 2016). A pesar de la existencia de indicadores biológicos de inflamación, estos no son lo suficientemente específicos, ya que pueden verse afectados por cualquier proceso inflamatorio no perteneciente a la enfermedad, o en el caso de la proteómica y metabolómica, son técnicas demasiado costosas y con una gran cantidad de variables obtenidas, dificultando la identificación y caracterización de estos analitos como posibles biomarcadores.

4.2.4 Aminoácidos como biomarcadores de hemorragia subaracnoidea

Otros procesos metabólicos y fisiopatológicos que también se encuentran implicados en el desarrollo de la HSA incluyen la participación de algunos aminoácidos con potencial uso de biomarcadores. Entre ellos se encuentran los aminoácidos arginina y citrulina, precursores del óxido nítrico (NO), principal molécula vasodilatadora (Pluta, 2008) y otros aminoácidos como glutamato y taurina que pueden ser utilizados para identificar y monitorear el daño neuronal tras sufrir el evento hemorrágico (Mendioroz-Iriarte *et al.*, 2009).

4.2.4.1 Glutamato

El L-glutamato o ácido 2-aminopentanodioico (figura 2a) es un aminoácido dicarboxílico no esencial sintetizado en la neurona a partir del α -cetoglutarato mediante reacciones de transaminación. Una vez liberado al espacio extracelular, es transportado a los astrocitos donde reacciona con el amoniacio (NH_3) para formar el ácido 2-amino-4-carbamoilbutanoico o también denominado L-glutamina (figura 2b). Posteriormente, los astrocitos liberan la glutamina, la cual es recuperada por las neuronas para convertirse

nuevamente a glutamato por la enzima glutaminasa, siendo glutamina el principal reservorio de este aminoácido (Siegel *et al.*, 2005). El Glutamato se caracteriza por tener efecto estimulante en las neuronas y es considerado el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central (Farooqui *et al.*, 2008).



Figura 2. Estructura de los aminoácidos A) L-glutamato y B) L-glutamina

En estados patológicos como la HSA, suelen presentarse procesos de isquemia e hipoxia que conducen al trastorno de energía al cerebro. Las bombas de iones dependientes de trifosfato de adenosina (ATP) producen un desequilibrio en la homeostasis de los iones sodio, calcio y potasio, favoreciendo la despolarización permanente de las neuronas que liberan glutamato, el cual activa secuencialmente receptores sensibles al ácido kaínico, al ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) que provocan la consecuente extrusión del Mg^{2+} en receptores sensibles al ácido N-metil-D-aspartico (NMDA). Los receptores antes mencionados son activados por glutamato como agonista principal que desencadenan la activación de los receptores metabotrópicos de dicho aminoácido, culminando a manera de retroalimentación positiva en una liberación excesiva, lo cual contribuye significativamente al daño neuronal por medio de la activación de la cascada excitotóxica generada por la acumulación de glutamato en neuronas postsinápticas (Sahu *et al.*, 2017).

4.2.4.2 Taurina

El ácido 2-amino-etano-sulfónico (figura 3) situado en el endotelio, células gliales y neuronas, es sintetizado a partir del aminoácido azufrado metionina mediante reacciones de desmetilación, descarboxilación y oxidación mediante la vía de la cisteína ácidos sulfínicos (Cañas, 2002).

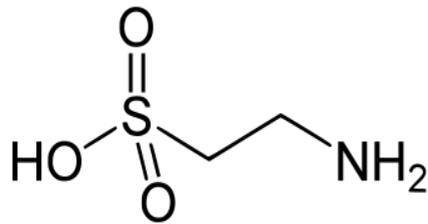


Figura 3. Estructura del aminoácido taurina

El edema cerebral también se presenta como una complicación en la HSA a través de la hinchazón astrocitaria, la cual se encuentra regulada por iones y osmolitos orgánicos como la taurina (Barges-Coll, 2013). Se sugiere que este aminoácido participa en la regulación del volumen celular y osmolar mediante su absorción o liberación celular que, en condiciones patogénicas como la HSA desencadenan su efluente en el sistema nervioso central. Además, la activación de los receptores de NMDA también conduce a una liberación significativa de taurina en el espacio extracelular (Albrecht & Wegrzynowicz, 2005). Se ha observado un aumento en la concentración plasmática de este aminoácido en pacientes con HSA que presentan un mal resultado al momento del alta hospitalaria en comparación con voluntarios sanos; sin embargo, no está relacionado con la isquemia cerebral tardía, una de las complicaciones observadas en este tipo de pacientes (Barges-Coll, 2013).

4.2.4.3 Arginina y citrulina

El ácido 2-amino-5-[diaminometilidenoamino]pentanoico) o L-arginina (figura 4a) y el ácido 2-amino-5-[carbamoilamino]pentanoico), también llamado L-citrulina (figura 4b), son aminoácidos precursores de la síntesis de óxido nítrico (NO), molécula producida por diferentes tipos celulares, entre ellos las neuronas. Su función es regular el tono vascular, activación plaquetaria y trombosis. La producción de NO ocurre mediante la conversión metabólica de L-arginina a L-citrulina en cantidades equimolares, la cual es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa [NOS] (El-Hattab *et al.*, 2014; Pérez-Neri, 2015).

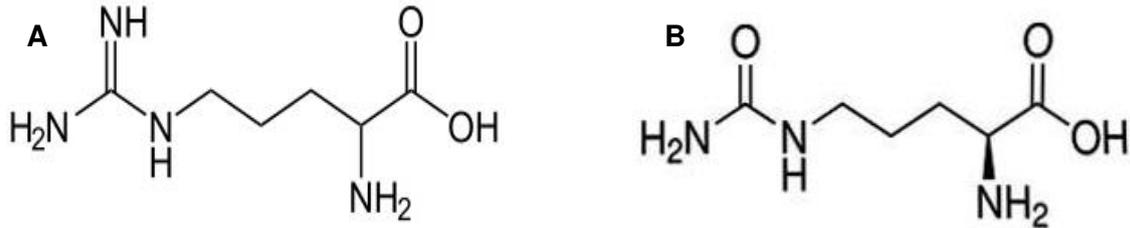


Figura 4. Estructura de los aminoácidos A) L-arginina y B) L-citrulina

La liberación de NO produce la dilatación arterial cerebral; sin embargo, el vasoespasmo producido después de la HSA se asocia con una reducción del 40% en la producción de NO por las células endoteliales y neuronales donde se lleva a cabo su síntesis a partir de arginina y citrulina. Aunado a esto, los productos hemo oxidados que son liberados tras el evento hemorrágico eliminan el NO libre y provocan la síntesis de inhibidores endógenos de NO endotelial. La propagación de la lesión isquémica exagera la muerte de neuronas que expresan el NO y favorece la producción de NO de naturaleza inducible, cuyos efectos tóxicos son la formación de radicales libres, agentes que causan daños al ADN y que culminan en la muerte neuronal (Bonow *et al.*, 2016).

4.2.4 Cuantificación de aminoácidos en muestras biológicas

La determinación de aminoácidos en muestras biológicas tiene el inconveniente de la presencia de un número considerable de aminoácidos en un amplio rango de concentraciones. Los métodos usados para su determinación incluyen técnicas cromatográficas que permiten una alta especificidad, sensibilidad, linealidad y reproducibilidad para su cuantificación. Entre ellas destacan la cromatografía de gases, de intercambio iónico y de líquidos, siendo ésta última la más empleada para el análisis debido a su sensibilidad, alto rendimiento y simplicidad (Malaver-Ortega *et al.*, 2009).

4.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de aminoácidos

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es la técnica analítica de cuantificación más empleada debido a su versatilidad e idoneidad en la separación de especies no volátiles o termolábiles (Skoog, 2008).

Su fundamento consiste en la separación del analito que se encuentra incluido en una mezcla por medio de su distribución entre una fase móvil (disolvente con cierto grado de polaridad) y una fase estacionaria (sólido empacado dentro de una columna). La separación se logra gracias a que el analito es transportado dentro de la fase móvil a través de la fase estacionaria, interaccionando con la superficie de este medio poroso para dar como resultado diferentes tiempos de migración para cada uno de los componentes de la mezcla (Kazakevich & LoBrutto, 2007).

Los componentes básicos de un sistema cromatográfico de líquidos son:

- Dispositivo de suministro de eluyentes (bomba)
- Dispositivo de inyección
- Columna analítica
- Detectores

4.3.1 Detectores

Los detectores empleados en CLAR se han diseñado para responder al soluto que eluye, y se han adaptado para medir bajas concentraciones del analito. Se clasifican según respondan a alguna propiedad fisicoquímica del soluto, tal es el caso de la absorción en detectores UV/vis, fluorescencia y electroquímico, o bien en función de su masa-carga, índice de refracción, constante dieléctrica y densidad (Skoog, 2008). El detector ideal debe ser altamente sensible, con un amplio rango lineal y que no sea afectado por el cambio de temperatura o la composición de la fase móvil (Kazakevich & LoBrutto, 2007).

Los detectores empleados para la cuantificación de aminoácidos incluyen la espectrometría de masas, el cual es altamente sensible y específico; sin embargo, es un método muy costoso y difícil de emplear en el área clínica (Wu *et al.*, 2016). Por otra parte, el uso de detectores con lámparas UV/vis o de fluorescencia solo es posible mediante técnicas de derivatización pre o postcolumna debido a la ausencia de grupos cromóforos o fluoróforos, siendo el detector de fluorescencia el más utilizado debido a su sensibilidad y estabilidad en comparación con el UV/vis (Harder *et al.*, 2011).

4.3.2 Detector de fluorescencia

La fluorescencia ocurre cuando un compuesto absorbe radiación (excitación) y luego la emite a una mayor longitud de onda (emisión). Este fenómeno es exhibido por moléculas rígidas que poseen una gran cantidad de electrones Pi (π) deslocalizados (Kazakevich & LoBrutto, 2007). La radiación emitida se mide normalmente con el objeto de evitar interferencias, en dirección perpendicular a la de incidencia del haz de luz de excitación, siendo posible la detección específica de grupos funcionales en función a las longitudes de onda seleccionadas, tanto de excitación como de emisión.

Además de utilizarse para el análisis de compuestos fluorescentes, también puede ser utilizado para analizar compuestos que no presentan fluorescencia intrínseca mediante una derivatización conveniente de estos. Así, solutos que no tienen fluorescencia intrínseca se pueden unir a determinadas moléculas muy reactivas que presentan fluorescencia para ser analizadas posteriormente. Como reactivos para la derivatización se pueden emplear cloruro de dansilo, fluorescamina y o-ftalaldehído (Cui *et al.*, 2017). El agente derivatizante más usado en CLAR-DFL para el análisis de aminoácidos es el o-ftalaldehído (OPA), ya que reacciona fácilmente con grupos amino para formar productos altamente fluorescentes cuando está en presencia de exceso de tioles que pueden ser fácilmente detectado a determinadas longitudes y separado por una columna de fase reversa (Frank & Powers, 2007).

4.4 Validación de un método analítico cromatográfico

La validación de un método analítico es necesaria porque proporciona un alto grado de confianza, seguridad y calidad en la medición del o de los analitos analizados. La agencia gubernamental de los Estados Unidos de Norteamérica FDA (Food Drug and Administration) define a la validación como una serie de procedimientos que demuestran que un método es reproducible y confiable para cumplir con el propósito para el cual fue diseñado. En México, la NOM-177-SSA1-2013 establece las pruebas que se deben incluir en una validación analítica, las cuales son linealidad, selectividad, límite inferior de cuantificación, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud y estabilidad.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aproximadamente del 50% de los pacientes que sobrevive tras haber sufrido un evento de HSA, un 30% sufre de déficits neurológicos graves a nivel físico, funcional, mental y social que afectan su calidad de vida (Rothwell *et al.*, 2009; Cantú-Brito *et al.*, 2011; Bornstein & Poon, 2012), generando un alto costo económico y humano para las familias de estos pacientes y para las instituciones de salud pública (Horcajadas *et al.*, 2015; Gonzales-Portillo *et al.*, 2016). Es conocido que la manifestación clínica inicial puede ser un factor de pronóstico en pacientes con grados IV y V de la escala Hunt & Hess y grados III y IV de la escala Fisher; sin embargo, en los pacientes con grados I, II y III de la escala Hunt & Hess, sí como I y II en la escala Fisher e incluso con un puntaje alto en la escala de coma Glasgow, puede ocurrir un error en la predicción del desenlace clínico de los pacientes debido a complicaciones no detectadas mediante los métodos de imagen de rutina. Estas complicaciones incluyen edema cerebral, vasoespasmo, resanrados aneurismáticos, daño oxidante e inflamación, las cuales son las principales causas de mortalidad y morbilidad de esta enfermedad (Barges-Coll *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2016). Por lo tanto, se considera que el empleo de las escalas de evaluación clínica inicial no suele ser suficiente para establecer un pronóstico en estos pacientes, y se requieren otras alternativas de seguimiento que permitan predecir la presencia de futuras complicaciones en la salud del paciente.

VI. JUSTIFICACIÓN

La fisiopatología multifactorial que presenta la HSA, combinada con un pobre resultado funcional, subraya la necesidad de identificar nuevas alternativas de diagnóstico y seguimiento capaces de informar a corto, mediano y largo plazo sobre el estado de salud de pacientes con riesgo de presentar futuras complicaciones neurológicas.

Los biomarcadores son considerados como una alternativa de diagnóstico en el área clínica que desempeñan un papel importante en la investigación biomédica, y que pueden establecer la presencia y progresión de una enfermedad. Se propone como posibles biomarcadores de HSA los aminoácidos taurina, arginina, citrulina y glutamato, los cuales

se encuentran asociados con el flujo sanguíneo, edema, respuesta vascular cerebral y neurotoxicidad.

La concentración de estos aminoácidos en plasma y su correlación con el diagnóstico de imagen, pruebas clínicas de gabinete, variables ambientales y escalas de evaluación clínica (Fisher, Hunt & Hess, coma y desenlace Glasgow), determinarán su potencial uso como biomarcadores de pronóstico capaces de brindar información sobre la posible aparición de complicaciones futuras y permitan la aplicación de tratamientos oportunos según sea el caso.

VII. HIPÓTESIS

En pacientes con hemorragia subaracnoidea, las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos glutamato, taurina, arginina y citrulina determinadas al momento del ingreso hospitalario, tendrán correlación estadística con el puntaje obtenido en las escalas de evaluación clínica de los pacientes a los 8 meses de su egreso.

VIII. OBJETIVOS

8.1 General

Caracterizar como biomarcadores de pronóstico las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos glutamato, taurina, arginina y citrulina en pacientes con hemorragia subaracnoidea.

8.2 Específicos

- i. Desarrollar y validar de acuerdo con la NOM-177-SSA-2013 el método para el análisis cuantitativo simultáneo en plasma de glutamato, taurina, arginina y citrulina mediante CLAR-DFL.
- ii. Determinar las concentraciones plasmáticas de glutamato, taurina, arginina y citrulina en pacientes con HSA y sujetos sanos.
- iii. Determinar los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos (NOx) mediante la reacción de Griess en pacientes con HSA y sujetos sanos.
- iv. Determinar el grado de correlación entre las concentraciones plasmáticas de glutamato, taurina, arginina, citrulina y NOx con el diagnóstico de imagen, las variables clínicas, ambientales, y con el valor obtenido en las escalas de evaluación clínica al momento del ingreso y de 8 meses después.

IX. METODOLOGÍA

9.1 Reactivos y equipo utilizado

9.1.2 Reactivos

- Metanol, grado HPLC
- Agua desionizada
- Ácido acético, grado reactivo
- Ácido perclórico, 70%
- Tetrahidrofurano, grado reactivo
- Orto-ftalaldehído, grado HPLC
- 2-mercaptoetanol, grado HPLC
- Sulfato de zinc ($ZnSO_4$), 99%
- Cloruro de vanadio III (VCl_3), 99%
- Ácido clorhídrico (HCl), 36%
- Ácido fosfórico (H_3PO_4), 85%
- Sulfanilamida, 99%
- N-(1-naftiléndiamina), 98%

9.1.3 Sustancias de referencia

- Ácido L-glutámico, pureza 99%, Sigma Aldrich
- L-citrulina, pureza 99%, Sigma Aldrich
- L-arginina, pureza 99%, Sigma Aldrich
- L-glutamina, pureza 99%, Sigma Aldrich
- Taurina, pureza 99%, Sigma Aldrich
- Nitrato de sodio, pureza 99%, Sigma Aldrich

9.1.4 Equipos e instrumentos

- Ultracentrífuga, marca CRM Globe, modelo Centrificient III
- Balanza analítica, marca Sartorius, modelo BA106P
- Ultracongelador, marca Arctiko, modelo UPLTF 90/275
- Vórtex, marca Velp Scientifica, modelo RX3
- Sistema CLAR-DFL, marca Agilent Technologies, modelo 1100
- Espectrofotómetro UV/Vis, marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25
- Refrigerador

9.2. Validación del método analítico por CLAR-DFL

9.2.1 Preparación de soluciones

- **Fase móvil (buffer de acetatos pH 5.9):**

En un vaso de precipitado de 1000 mL que contenía 800 mL de agua desionizada, se adicionaron 2.9 mL de ácido acético y se ajustó a pH 5.9 ± 0.05 con hidróxido de sodio (NaOH), una vez obtenido el pH requerido, se aforó a 1000 mL. De la solución anterior de ácido acético/agua, se retiraron 15 mL, el volumen retirado fue compensado con tetrahidrofurano. La solución obtenida fue filtrada mediante un sistema de filtrado con bomba de vacío.

- **Buffer de boratos 0.3 M:**

Se disolvieron 1.8549 g de ácido bórico (H_3BO_3) en 85 mL de agua desionizada y se ajustó el valor de pH a 9.5 ± 0.05 con hidróxido de sodio (NaOH). Una vez obtenido el pH requerido, se aforó a un volumen de 100 mL.

- **Reactivo de derivatización (OPA):**

Se disolvieron 25 mg de O-ftalaldehído (OPA) en 625 μ L de metanol grado HPLC. Una vez disuelto, se adicionaron 25 μ L de β -mercaptoetanol y 5.6 mL del buffer de boratos 0.3 M pH 5.9 previamente preparado. La solución fue almacenada bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C.

- **Solución saturada de carbonato de potasio (K_2CO_3):**

En un vaso de precipitado de 100 mL que contenía 60 mL de agua desionizada, se agregó con agitación constante carbonato de potasio hasta que éste ya no pudo ser disuelto. La solución se dejó en reposo hasta su completa sedimentación para la utilización del sobrenadante.

- **Diluyente de fase móvil:**

Se mezclaron de buffer de acetatos pH 5.9 y metanol grado HPLC en una proporción 60/40 (% v/v).

9.2.2 Preparación de soluciones stock

- **Soluciones stock A. (aminoácidos 166.6 mM):**

Se pesó el equivalente a 166.6 mM de cada aminoácido de interés (tabla 4), los cuales fueron disueltos y aforados a 10 mL con agua desionizada. Una vez preparada cada solución, se almacenó en refrigeración a 4 °C.

Tabla 4. Preparación de las soluciones stock A para el método analítico.

Aminoácido	Concentración	Cantidad a pesar (g)
Ácido glutámico	166.6 mM	0.2451
Glutamina	166.6 mM	0.2435
Citrulina	166.6 mM	0.2919
Arginina	166.6 mM	0.2902
Taurina	166.6 mM	0.2085

- **Solución stock B (solución aminoácidos 16.66 mM):**

De cada una de las soluciones preparadas en la solución stock A, se transfirió una alícuota de 1000 μ L (1 mL) a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó a volumen con agua desionizada. Estas soluciones fueron almacenadas en refrigeración 4 °C.

- **Solución stock C (solución aminoácidos 4. 165 mM):**

De cada una de las soluciones preparadas a 166.6 mM (solución stock A), se transfirió una alícuota de 250 μ L a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con agua desionizada. Estas soluciones fueron almacenadas en refrigeración 4 °C.

9.2.3 Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas para el análisis de muestras son descritas a continuación (tabla 5).

Tabla 5. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de aminoácidos en plasma

Condiciones cromatográficas				
Detector empleado	Espectrometría de fluorescencia.			
Columna	Agilent Zorbax Eclipse AAA C18 4.6 mm X 150 mm 3.5µm.			
Volumen de inyección	20 µL (10 µL de muestra y 10 µL de OPA).			
Temperatura de trabajo	Temperatura ambiente (≈22°C)			
Lavado	Agua desionizada/metanol (50%/50% v/v)			
Tiempo de corrida	15 minutos			
Tiempo entre cada inyección	4 minutos			
Fase móvil	Gradiente: A. Buffer acetatos pH 5.9/tetrahidrofurano 1.5% B. Metanol grado HPLC.			
	Proporciones de fase móvil			
	Tiempo (min)	Velocidad de Flujo (mL/min)	%Disolvente A (Buffer acetatos pH 5.9)	%Disolvente B (Metanol)
	0.00	0.500	60	40
	2.00	0.500	60	40
	4.00	0.500	62.40	37.6
	8.00	1.150	65.30	34.7
	15.00	1.200	1.00	99.0
Tiempos de retención aproximados:	Glutamato: 3.8 – 4.1 minutos. Citrulina: 6.9 – 7.3 minutos. Arginina: 7.4 – 7.6 minutos. Taurina: 10.6 – 10.9 minutos.			

9.2.4 Condiciones del detector

Para el análisis cromatográfico de los aminoácidos de interés, los parámetros de detección de la lámpara de fluorescencia fueron los siguientes:

- Señal de excitación: 340 nm
- Señal de emisión: 450 nm

9.2.5 Preparación de curvas de calibración y puntos control

La curva de calibración se preparó a partir de las soluciones stock B y C descritas anteriormente mediante el método de estándar adicionado. Se evaluaron 7 niveles de concentración (tabla 6), los cuales fueron aforados con plasma. De igual manera se

prepararon 3 puntos control (tabla 7) independientes a los de la curva de calibración que corresponden a la muestra control baja (MCB), muestra control medio (MCM) y muestra control alto (MCA).

Tabla 6. Preparación de curva de calibración en plasma de los aminoácidos glutamato, glutamina, taurina, citrulina y arginina.

Solución de trabajo	μL de solución stock B (16.66 mM)	Volumen final aforo (mL)	Concentración final de aminoácidos (μM)
Concentración 7	24	5	80
Solución de trabajo	μL de solución stock C (4.165 mM)	Volumen final aforo (mL)	Concentración final de aminoácidos (μM)
Concentración 6	48	5	40
Concentración 5	24	5	20
Concentración 4	18	5	15
Concentración 3	12	5	10
Concentración 2	6	5	5
Concentración 1	6	25	1

Tabla 7. Preparación de los puntos control en plasma de los aminoácidos glutamato, glutamina, taurina, citrulina y arginina.

Solución de trabajo	μL de solución stock B (16.66 mM)	Volumen final aforo (mL)	Concentración final de aminoácidos (μM)
MCA	21	5	70
Solución de trabajo	μL de solución stock C (4.165 mM)	Volumen final aforo (mL)	Concentración final de aminoácidos (μM)
MCM	36	5	30
MCB	9	5	7.5

9.2.6 Procesamiento de la muestra

La cuantificación de aminoácidos se realizó de acuerdo con las condiciones cromatográficas descritas anteriormente, empleando como método de extracción la precipitación de proteínas por pH ácido. El procedimiento fue el siguiente, de cada una de las muestras descritas en las tablas 6 y 7, se tomaron 500 μL y se colocaron en tubos de ensaye para llevar a cabo el proceso de extracción. Se adicionaron 50 μL de ácido perclórico y se agitaron en vórtex 30 segundos para desnaturalizar y precipitar las proteínas del plasma. Para neutralizar la reacción anterior, se adicionaron 50 μL de

solución saturada de carbonato de potasio y se agitó en vórtex durante 30 segundos. Se adicionaron 400 μL de fase móvil en proporción inicial como diluyente (60% solución buffer acetatos pH 5.9 y 40% metanol), agitando nuevamente 30 segundos. La mezcla formada fue ultracentrifugada a 14,000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se transfirió el sobrenadante a viales ámbar de 2 mL, los cuales fueron colocados en el sistema de cromatografía para su posterior inyección bajo las condiciones cromatográficas descritas en el punto 9.2.3.

9.2.7 Preparación de los parámetros de validación

Cada país posee organismos gubernamentales encargados de definir y establecer los criterios para llevar a cabo las actividades de validación. En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) a través de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA-2013 establece los requisitos para llevar a cabo el análisis de muestras biológicas, las cuales fueron las siguientes.

- **Selectividad:**

Se define como la capacidad del método para identificar/cuantificar el o los analitos de interés en presencia de componentes endógenos y exógenos que puedan estar presentes en la muestra biológica de estudio bajo las condiciones exigidas por el método. La prueba consistió en evaluar y comparar el tiempo de retención de cada uno de los aminoácidos de interés presentes en 5 unidades de matriz biológica (material biológico en el que se encuentra el analito de interés) con estándares preparados a la misma concentración en solución acuosa.

- **Linealidad:**

Es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito adicionado en un intervalo de trabajo definido. Para su determinación, se analizaron cuatro curvas de calibración a siete niveles de concentración (tabla 6) dentro de un intervalo de trabajo de 1 μM a 80 μM para cada uno de los aminoácidos. Las correlaciones se construyeron como ABC vs concentración, donde ABC es el área bajo la curva obtenido para cada aminoácido. La

linealidad se determinó a través del coeficiente de correlación igual o mayor a 0.99 ($r \geq 0.99$) y se calculó la concentración recuperada respecto a la concentración nominal.

- **Límite inferior de cuantificación:**

Se define como la concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud, determinada en función de las necesidades de cuantificación del estudio. Este criterio se determinó por medio del análisis por quintuplicado de la concentración más baja de la curva de calibración (1 μM) para cada uno de los aminoácidos.

- **Precisión:**

Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí. La precisión se determina en condiciones repetibles y reproducibles.

- **Repetibilidad:**

Se establece cuando el mismo analista procesa muestras durante una misma sesión de trabajo (día), empleando los mismos reactivos y equipo de cuantificación en el mismo laboratorio. La prueba consistió en preparar por quintuplicado en un mismo día de análisis las siguientes muestras control: límite inferior de cuantificación y los puntos control bajo, medio y alto (LIC, MCB, MCM y MCA respectivamente). Se calculó la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración.

- **Reproducibilidad:**

La reproducibilidad implica cualquier cambio en las condiciones de trabajo anteriormente descritas (analista, día, reactivos, instrumento o laboratorio). La prueba consistió en analizar tres diferentes corridas analíticas de las siguientes muestras control: LIC, MCB, MCM y MCA, cada una por quintuplicado en tres diferentes días de trabajo. Para cada muestra se calculó la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica con la curva de calibración.

- **Exactitud:**

Describe la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente con el valor del analito adicionado. De los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la

desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Desv} = \left| 100 \times \left(\frac{\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración adicionada}} \right) \right|$$

- **Estabilidad:**

Demuestra las condiciones en las que él o los analitos de interés se mantienen estables, al menos durante el procedimiento de análisis y almacenamiento (tiempo y temperatura). Se valoraron dos tipos de estabilidad:

- **Estabilidad en el automuestreador:**

Se prepararon por triplicado las MCB y MCA, las cuales fueron colocadas en el automuestreador del equipo cromatográfico a temperatura ambiente durante 24 horas. Posterior a este tiempo, se inyectaron al sistema cromatográfico. Se calculó la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica con la curva de calibración preparada el día del análisis.

- **Estabilidad a largo plazo:**

Se prepararon por triplicado las MCB y MCA, las cuales fueron almacenadas durante 60 días a temperatura de congelación de $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez concluido el tiempo de almacenamiento, se inyectaron al sistema cromatográfico. Se calculó la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica con la curva de calibración preparada el día del análisis y fueron comparadas con las mismas concentraciones preparadas el día del análisis.

9.3 Determinación de la concentración plasmática de aminoácidos

9.3.1 Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio piloto de tipo transversal para la cuantificación de aminoácidos, nitratos y nitritos en pacientes con hemorragia subaracnoidea que ingresaron al área de Terapia Endovascular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN).

9.3.2 Población y muestra

Sujetos: Se estudió un grupo de voluntarios sanos y un grupo de pacientes con diagnóstico de HSA.

Grupo control (Voluntarios sanos): Se incluyó a 12 individuos sanos de población mexicana.

Grupo de Pacientes: Se captaron 12 pacientes que fueron ingresados al área de terapia endovascular por diagnóstico de hemorragia subaracnoidea.

De cada paciente se registró la siguiente información: género, edad, procedencia, ocupación, peso, talla, pruebas clínicas de laboratorio, diagnóstico de imagen e historial clínico.

9.3.3 Criterios de selección del estudio

Se obtuvo la autorización 086/16 de los comités institucionales de bioética y de investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” para el reclutamiento pacientes con hemorragia subaracnoidea que fueron ingresados al área de terapia endovascular con base en los siguientes criterios:

9.3.3.1 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión del estudio para cada grupo fue el siguiente:

- **Para voluntarios sanos:**

- Población mexicana en general que aceptó participar firmando el consentimiento informado (anexo 1).
- Hombres y mujeres de edad entre 15 y 75 años.
- Índice de masa corporal (IMC) 18.0-27.0 kg/m²
- Individuos sin antecedentes de abuso y dependencia al alcohol, sustancias psicoactivas o uso crónico de medicamentos.

- **Para pacientes**

- Población mexicana que haya sido ingresada al área de Terapia Endovascular del INNN por hemorragia subaracnoidea.
- Pacientes admitidos al INNN dentro de las primeras 24 horas.
- No haber tomado ningún medicamento al menos 8 horas antes.
- No haber recibido algún tipo de tratamiento quirúrgico.

- Pacientes que aceptaron participar en el estudio mediante la firma del consentimiento informado (responsable legal).
- Hombres y mujeres mayores de 15 años.

9.3.3.2 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión para la realización del estudio fueron los siguientes:

- **Voluntarios sanos:**

- Individuos que no aceptaron participar en el estudio y/o no firmaron el consentimiento informado.
- Individuos menores de 15 años.
- Individuos cuyo IMC sea menor a 18.0 o mayor a 27.0 kg/m²
- Individuos que estén bajo algún tipo de tratamiento farmacológico.

- **Pacientes:**

- Pacientes que no aceptaron participar en el estudio.
- Pacientes que no firmaron el consentimiento informado.
- Pacientes menores de 15 años.
- Pacientes que no hayan sido diagnosticados con hemorragia subaracnoidea.
- Pacientes que no cumplieron con las condiciones necesarias para la toma de muestra sanguínea.
- Pacientes con tratamiento farmacológico o quirúrgico.

9.3.4 Toma y tratamiento de la muestra

Una vez obtenido el consentimiento informado del paciente con diagnóstico de hemorragia subaracnoidea y de los voluntarios sanos, se procedió a la obtención de la muestra biológica mediante punción venosa en tubos con EDTA como anticoagulante (4 mL). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm para separar el plasma del paquete globular. Una vez obtenido el plasma, se congeló y almacenó a temperatura de -80°C en ultracongelador hasta su análisis cromatográfico.

Adicionalmente, se llevó a cabo la determinación plasmática del aminoácido glutamina con las condiciones cromatográficas e intervalo de trabajo descritos anteriormente. La concentración plasmática se calculó mediante la interpolación de la respuesta analítica con la curva de calibración preparada en solución acuosa.

9.3.5 Aplicación de la escala de desenlace Glasgow

El empleo de la escala de desenlace Glasgow (del inglés, *Glasgow outcome scale*) en pacientes con HSA permitió estandarizar de forma objetiva su grado de recuperación. Para ello, se obtuvo información de cada paciente mediante la revisión de expediente clínico con previa autorización. El cuidador de los pacientes fue localizado mediante llamada telefónica 8 meses después del ingreso hospitalario y se le encuestó sobre la autonomía del paciente en la realización de actividades cotidianas mediante la aplicación de la escala de resultados Glasgow (anexo 2).

9.4 Cuantificación plasmática de nitratos y nitritos (NOx)

El método espectrofotométrico empleado para la cuantificación de NOx, se basa en la formación de un colorante azo por reacción de NO_2^- con la sulfanilamida en condiciones ácidas que posteriormente es revelada con N-(-naftil) etilendiamina (Tsikas, 2007). La preparación de reactivos y condiciones del equipo se describen a continuación.

9.4.1 Preparación de soluciones

- **Ácido clorhídrico 1 M:**

En un matraz volumétrico de 50 mL que contenía 30 mL de agua desionizada, se agregaron 4.14 mL de HCl al 37 %. La solución se mezcló y aforó a volumen.

- **Solución saturada de cloruro de vanadio III:**

En un vaso de precipitado de 100 mL, se colocaron 0.40 g de cloruro de vanadio y lentamente se adicionaron 50 mL de HCl 1 M, los cuales fueron disueltos con ayuda de un agitador magnético. La solución se filtró con membrana de poro de 0.45 μm y se almacenó en oscuridad a una temperatura de refrigeración de 4 °C, siendo estable en estas condiciones dos semanas.

- **Sulfato de zinc 1M:**

En un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvieron 2.8758 g de sulfato de zinc con agua desionizada y se aforó a volumen.

- **Reactivo de Griess:**

Se mezclaron en una proporción 1:1, sulfanilamida al 1% disuelta en ácido fosfórico (HPO₃) al 5% con 0.1% de N-(1-naftiletilendiamina). Las soluciones fueron almacenadas por separado a temperatura de refrigeración de 4 °C y mezcladas los días de análisis.

9.4.2 Preparación de la solución stock

- **Soluciones nitrato de sodio 4.165 mM:**

En un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvió con agua desionizada 0.0354 g de nitrato de sodio y se aforó a volumen. La solución fue almacenada en refrigeración a 4 °C hasta el día de análisis.

- **Preparación de la curva de calibración:**

La curva de calibración se preparó a partir de la solución stock de nitrato de sodio 4.165 mM. Se evaluaron 6 niveles de concentración (tabla 8), llevando al aforo con agua desionizada. Se tomaron 200 µL de muestra de cada punto de la curva, los cuales fueron procesados como a continuación se describe.

Tabla 8. Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de NO_x

Solución de trabajo	µL de solución stock (4.165 mM)	Volumen final aforo (mL)	Concentración final de nitratos (µM)
Concentración 1	6	5	5
Concentración 2	12	5	10
Concentración 3	24	5	20
Concentración 4	48	5	40
Concentración 5	72	5	60
Concentración 6	96	5	80

9.4.3 Cuantificación de NOx por espectrofotometría UV/visible

Del plasma obtenido mediante punción venosa, se tomaron 30 μL que fueron diluidos en 220 μL de agua desionizada para obtener un volumen total de 250 μL . A este volumen de muestra, se adicionaron 25 μL de solución de sulfato de zinc 1 M para precipitar las proteínas presentes en el plasma, y entre la adición de cada solución, se agitó durante 20 segundos en vórtex, centrifugando a 14,000 rpm durante 7 minutos. Se tomaron 200 μL del sobrenadante, los cuales fueron transferidos a tubos de ensaye para llevar a cabo el proceso de reducción a nitritos mediante la adición de 200 μL de cloruro de vanadio III. Posteriormente, se adicionaron 400 μL de reactivo de Griess, se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz para llevar a cabo la formación del compuesto. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro UV/vis a una longitud de onda de 540 nm. Las absorbancias obtenidas se registraron y convirtieron a contenido de NOx mediante la extrapolación en una curva de calibración realizada con concentraciones conocidas de nitratos. Los resultados fueron expresados en unidades micromolar (μM).

9.5 Análisis estadístico

La concentración plasmática de cada aminoácido y de nitratos/nitritos (NOx) fue comparado entre grupos (pacientes y voluntarios sanos) mediante la prueba t de Student. Las asociaciones entre aminoácidos y NOx con las puntuaciones de las diferentes escalas de evaluación clínica (Fisher, Hunt & Hess, coma y desenlace Glasgow) se evaluaron mediante la correlación de Spearman. Finalmente, los niveles plasmáticos de aminoácidos y NOx de acuerdo con el grado obtenido en la escala de coma Glasgow, fueron analizados mediante una ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Dunnett, tomando al grupo sin afectación de consciencia como grupo comparativo. Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico IBM SPSS versión 23 y con una significancia de $p < 0.05$.

X. RESULTADOS

10.1 Validación analítica CLAR-DFL

10.1.1 Selectividad

La evaluación de 5 unidades de matriz biológica demostró que el método es capaz de diferenciar los aminoácidos de interés en presencia de otras sustancias endógenas al comparar el cromatograma de la figura 5 correspondiente a la mezcla acuosa de aminoácidos con el cromatograma de la figura 6 que corresponde a la muestra.

No se observó la presencia de interferencias endógenas en los tiempos de retención de los aminoácidos glutamato, glutamina, taurina, arginina y citrulina, de tal forma que el método es adecuado para la cuantificación de estos aminoácidos.

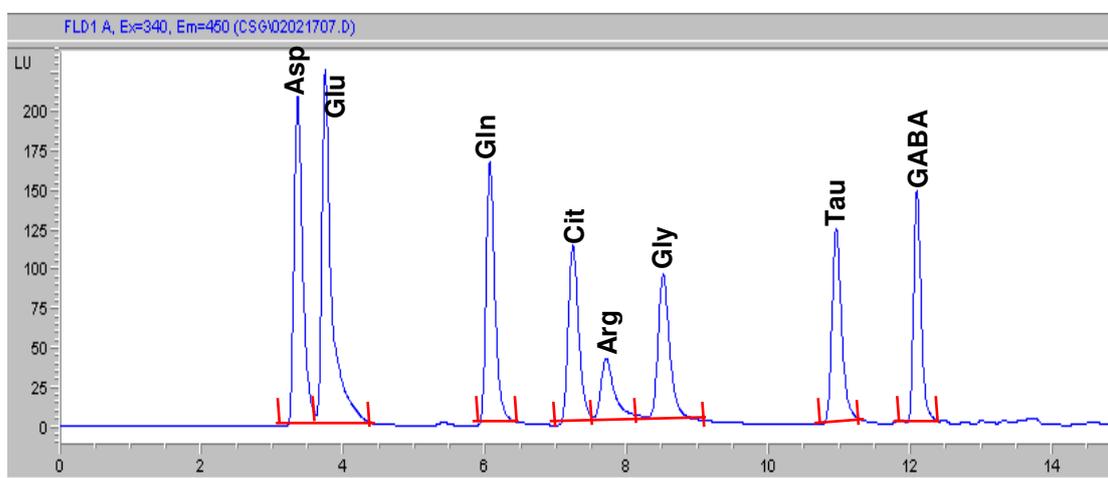


Figura 5. Cromatograma de los aminoácidos Glu, Tau, Cit y Arg en solución acuosa

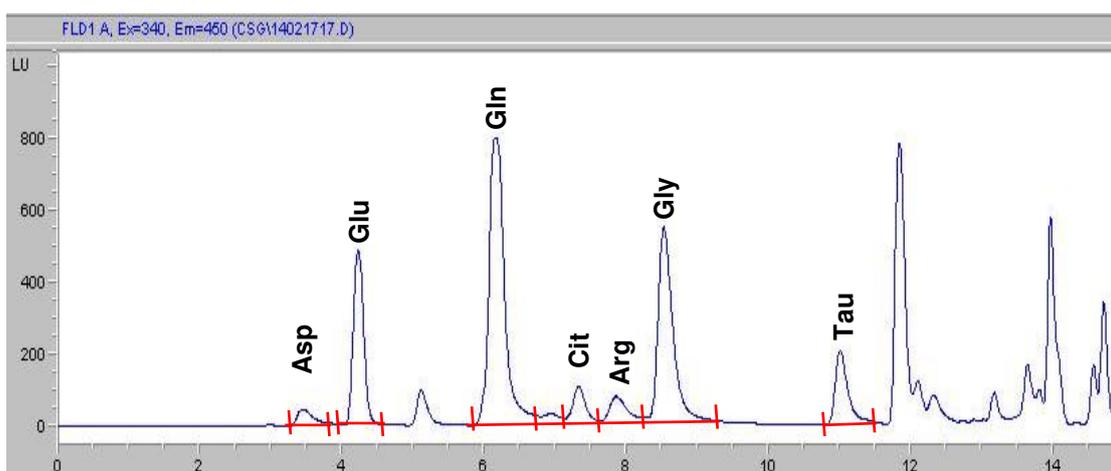


Figura 6. Cromatograma de los aminoácidos Glu, Tau, Cit y Arg en plasma.

10.1.1 Linealidad en plasma

Se demostró que el método es lineal al evaluar 4 curvas de calibración con 7 niveles de concentración. Se graficaron las áreas contra las concentraciones, obteniéndose un coeficiente de determinación (r^2) promedio de 0.9998 para glutamato, 0.9983 para taurina, 0.9999 para citrulina y 0.9998 para arginina (figura 7). Con los resultados obtenidos de las cuatro curvas, se calculó la relación de áreas promedio, la desviación estándar y el porcentaje (%) del coeficiente de variación.

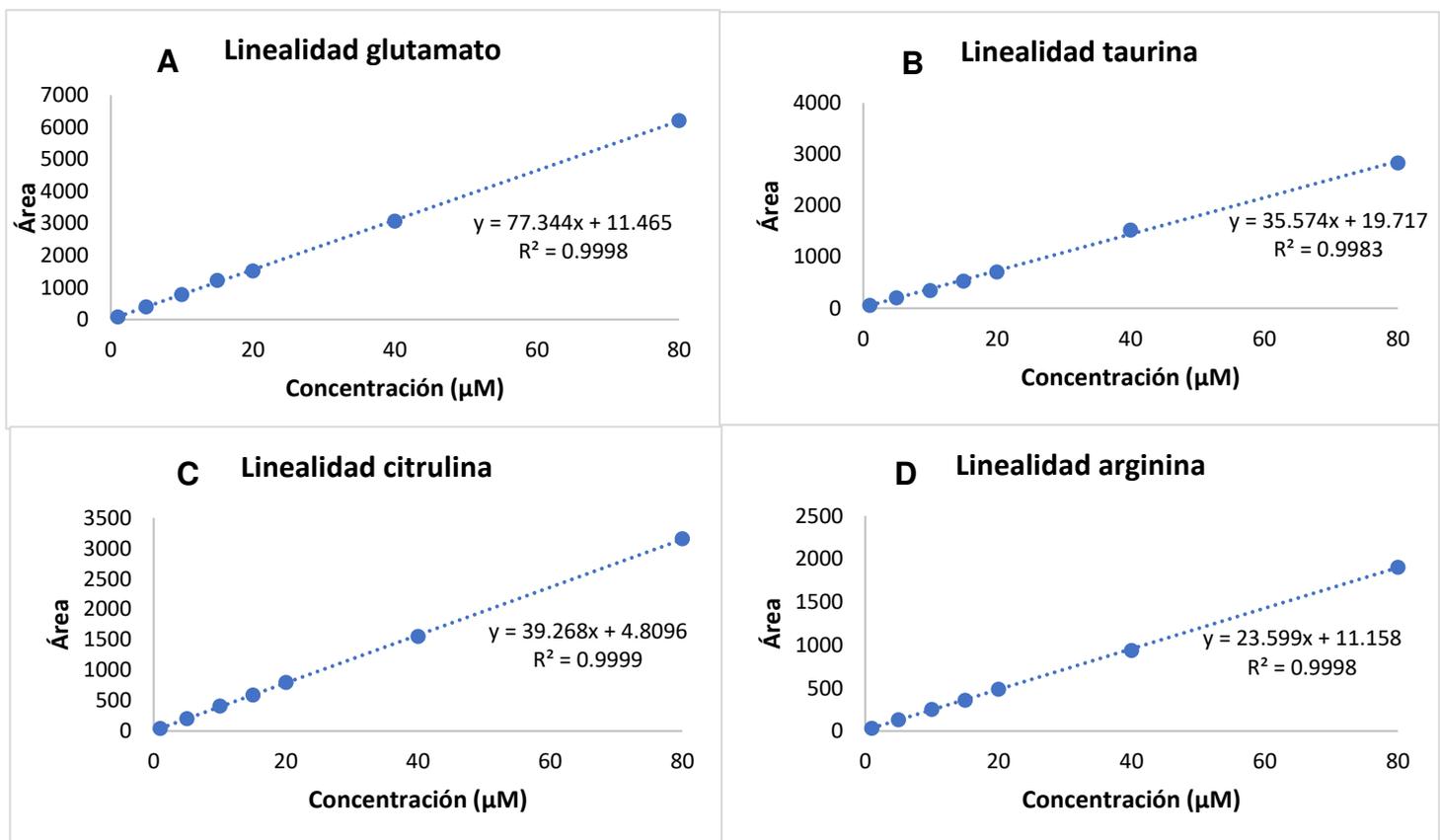


Figura 7. Curvas de calibración de los aminoácidos A) glutamato, B) taurina, C) citrulina y D) arginina.

De los datos de linealidad, se calculó la concentración recuperada y el porcentaje de desviación respecto a la concentración nominal para cada uno de los puntos de la curva de calibración (tabla 9).

Tabla 9. Concentración recuperada y porcentaje de desviación promedio de las curvas de calibración (%) para la cuantificación de aminoácidos.

Glutamato		
Concentración nominal (μM)	Promedio de la concentración recuperada (μM) de las 4 curvas de calibración	Promedio del % de desviación de las cuatro curvas de calibración
1	0.98	5.23
5	5.05	3.22
10	9.95	0.68
15	15.69	4.63
20	19.54	2.32
40	39.59	1.33
80	80.19	0.46
Citrulina		
1	0.95	8.00
5	5.05	2.32
10	10.27	2.73
15	14.88	1.28
20	20.19	1.26
40	39.41	1.68
80	80.23	1.44
Arginina		
1	0.97	12.91
5	4.40	11.95
10	8.67	13.31
15	13.47	10.21
20	17.85	10.73
40	36.00	9.99
80	72.22	9.72
Taurina		
1	1.08	9.06
5	5.29	5.72
10	9.24	7.60
15	14.43	3.77
20	19.42	2.89
40	42.42	6.04
80	79.12	1.10

De acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013, el método analítico para la cuantificación simultánea de glutamato, taurina, arginina y citrulina en plasma es lineal en un intervalo de concentración de 1 a 80 μM debido a que el coeficiente de correlación para cada una

de las rectas es mayor a 0.99, el porcentaje (%) de desviación no supera el 20% para el límite inferior de cuantificación y el 15% para los demás puntos de la curva, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido por la norma.

10.1.3 Límite inferior de cuantificación

Se evaluó por quintuplicado el valor más bajo de la curva de calibración, el cual correspondió a la concentración de 1 μM para cada uno de los aminoácidos evaluados. Los resultados mostraron un CV de 4.94% para glutamato, 6.37% para taurina, 8.88% para citrulina y 8.62% para arginina.

10.1.4 Evaluación de precisión y exactitud en las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad

10.1.4.1 Precisión en la prueba de repetibilidad

Los datos de la tabla 10 muestran que el método analítico es preciso al realizar las mediciones en un solo día de análisis bajo las mismas condiciones de trabajo para los aminoácidos glutamato, taurina, citrulina y arginina, ya que el % de CV en cada muestra control fue menor al 15% en las MCB, MCM, MCA y menor del 20% para el LIC.

Tabla 10. Repetibilidad del método para la cuantificación cromatográfica de aminoácidos.

Glutamato				
Muestra	Concentración nominal (μM)	Promedio (μM)	Desviación estándar	% CV
LIC	1	0.89	0.04	4.94
MCB	7.5	7.70	0.18	2.34
MCM	30	31.27	2.04	6.52
MCA	70	70.42	2.23	3.16
Citrulina				
LIC	1	1.04	0.09	8.88
MCB	7.5	7.74	0.22	2.89
MCM	30	31.41	2.16	6.87
MCA	70	72.70	2.93	4.03

Tabla 10. Repetibilidad del método para la cuantificación de aminoácidos (continuación).

Arginina				
Muestra	Concentración nominal (μM)	Promedio (μM)	Desviación estándar	%CV
LIC	1	0.99	0.08	8.62
MCB	7.5	7.52	0.36	4.78
MCM	30	32.44	0.97	2.98
MCA	70	73.67	4.60	6.24
Taurina				
LIC	1	1.09	0.07	6.37
MCB	7.5	7.19	0.41	5.65
MCM	30	31.23	1.46	4.68
MCA	70	74.21	1.97	2.65

10.1.4.2 Exactitud en la prueba de repetibilidad

En la tabla 11 se muestran los resultados del porcentaje (%) de desviación respecto a la concentración nominal de los niveles de concentración evaluados en la prueba de repetibilidad (LIC, MCB, MCM y MCA) para cada uno de los aminoácidos analizados. El método es exacto ya que el valor promedio del % de desviación cumple con lo establecido por la NOM-177-SSA1-2013, el cual es menor al 20% para el LIC y menor de 15% para las muestras control bajo, medio y alto.

Tabla 11. Exactitud del método para la cuantificación de aminoácidos a partir de los datos de repetibilidad. Se muestra el % de desviación promedio para cada nivel de concentración.

	Glutamato	Citrulina	Arginina	Taurina
Nivel de concentración	Promedio del % de desviación respecto al valor nominal			
LIC (1 μM)	11.19	8.32	6.78	6.01
MCB (7.5 μM)	2.78	3.49	3.92	4.12
MCM (30 μM)	6.53	6.94	8.12	5.18
MCA (70 μM)	2.41	3.98	7.28	9.21

10.1.4.3 Precisión en la prueba de reproducibilidad

Se evaluaron 3 corridas analíticas en 3 diferentes días las siguientes muestras: LIC, MCB, MCM y MCA cada una por quintuplicado. En la tabla 12 se muestran los resultados de reproducibilidad, donde se obtuvo un CV menor al 20% para muestras de LIC y menor al 15% para las MCB, MCM y MCA de cada uno de los aminoácidos.

Tabla 12. Reproducibilidad del método para la cuantificación de aminoácidos en plasma. Se muestra el valor promedio obtenido por cada nivel de concentración (n = 5).

Glutamato				
	LIC (1 µM)	MCB (7.5 µM)	MCM (30 µM)	MCA (70 µM)
Concentración promedio de los 3 días de análisis	1.03	7.60	30.33	71.28
%CV	6.94	2.74	4.67	3.09
Citrulina				
Concentración promedio de los 3 días de análisis	1.00	7.55	31.45	71.49
%CV	10.08	3.51	4.99	2.90
Arginina				
Concentración promedio de los 3 días de análisis	1.02	7.18	28.29	69.29
%CV	11.37	5.39	5.12	4.74
Taurina				
Concentración promedio de los 3 días de análisis	0.99	7.34	31.31	70.85
%CV	10.54	6.48	7.32	3.58

10.1.4.4 Exactitud en la prueba de reproducibilidad

Los resultados de exactitud de los datos de reproducibilidad se muestran en la tabla 13. El % de desviación respecto a la concentración nominal de las muestras evaluadas (LIC, MCB, MCM y MCA) se encuentra dentro del criterio de aceptación establecido por la NOM-177-SSA1-2013, el cual es menor al 20% para el LIC y menor de 15% para las muestras control bajo, medio y alto.

Tabla 13. Exactitud del método para la cuantificación de aminoácidos a partir de los datos de reproducibilidad. Se muestra el % de desviación promedio para cada nivel de concentración.

Glutamato				
	LIC 1 µM	MCB 7.5 µM	MCM 30 µM	MCA 70 µM
Promedio de la desviación (%DA) de los 3 día de análisis	6.66	2.41	4.07	3.38
Citrulina				
Promedio de la desviación (%DA) de los 3 día de análisis	8.21	2.86	5.24	2.93
Arginina				
Promedio de la desviación (%DA) de los 3 día de análisis	10.00	5.51	6.68	4.16
Taurina				
Promedio de la desviación (%DA) de los 3 día de análisis	8.55	5.60	8.34	3.07

De acuerdo con lo establecido en la NOM-177-SSA1-2013, se demuestra que el método para la cuantificación simultánea de los aminoácidos glutamato, taurina, arginina y citrulina es preciso y exacto.

10.1.5 Estabilidad

Las evaluaciones de estabilidad fueron establecidas de acuerdo con las condiciones de trabajo y almacenamiento propuestas para el análisis de aminoácidos en muestras plasmáticas: estabilidad en automuestreador y estabilidad a largo plazo, obteniéndose los siguientes resultados.

10.1.5.1 Estabilidad en automuestreador

El % de desviación respecto al valor nominal fue menor a lo establecido en el criterio de aceptación ($\leq 15\%$) para cada uno de los aminoácidos evaluados y comparados con muestras preparadas el día del análisis. Las muestras preparadas

fueron estables en el automuestreador durante 24 horas a temperatura ambiente (tabla 14). Por lo tanto, cumple con el criterio de aceptación establecido en la norma.

Tabla 14. Estabilidad de aminoácidos en el automuestreador (24 h, temperatura ambiente). Se muestra el % de desviación promedio para cada nivel de concentración.

Muestras de referencia					Muestra en el automuestreador, 24 horas, T° ambiente			
	Glutamato	Citrulina	Arginina	Taurina	Glutamato	Citrulina	Arginina	Taurina
Promedio del % de desviación MCB	1.27	4.56	6.15	9.14	2.75	2.55	8.51	3.82
Promedio del % de desviación MCA	3.92	2.13	3.45	2.94	3.62	2.74	8.56	1.29

10.1.5.2 Estabilidad a largo plazo

Las muestras fueron estables en un periodo de tiempo de 60 días y a una temperatura de congelación de -20 °C, donde el % de desviación respecto al valor nominal fue menor del 15% para cada uno de los aminoácidos evaluados y comparados con muestras preparadas el día del análisis (tabla 15).

Tabla 15. Estabilidad de aminoácidos a largo plazo (60 días, -20 °C). Se muestra el % de desviación promedio para cada nivel de concentración.

Muestras de referencia					Muestra en el automuestreador, 24 horas, T° ambiente			
	Glutamato	Citrulina	Arginina	Taurina	Glutamato	Citrulina	Arginina	Taurina
Promedio del % de desviación MCB	11.46	4.50	4.90	9.92	6.10	7.0	10.50	10.10
Promedio del % de desviación MCA	5.47	11.04	7.11	3.61	7.25	12.42	6.37	3.44

10.2 Cuantificación plasmática de aminoácidos

10.2.1 Características clínicas de los pacientes

Durante el período comprendido de febrero a junio de 2017, se reclutaron 12 pacientes con diagnóstico de HSA que fueron ingresados al área de terapia endovascular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y 12

voluntarios sanos. En la distribución por género de pacientes, 7 fueron mujeres (58%) y 5 hombres (42%) con una edad media general de 53.91 ± 4.84 años. Por otra parte, la edad media de los voluntarios sanos fue de 42.58 ± 3.35 años, e incluían 5 mujeres (42%) y 7 hombres (58%). La distribución de pacientes de acuerdo con el grado obtenido en las evaluaciones clínicas de Fisher, Hunt & Hess, coma y desenlace Glasgow se muestran en la siguiente tabla (tabla 16).

Tabla 16. Características generales de los pacientes con HSA (N = 12).

Variables	n	Variables	n
Género		Coma Glasgow	
Hombres	5	Normal	1
Mujeres	7	Moderado	7
Escala Fisher		Coma	4
Grado 1	1	Desenlace Glasgow	
Grado 2	1	Muerte	1
Grado 3	4	Estado vegetativo	0
Grado 4	6	Discapacidad grave	2
Escala Hunt y Hess		Discapacidad moderada	7
Grado 1	2	Buena recuperación	1
Grado 2	7		
Grado 3	2		
Grado 4	1		

10.2.2 Niveles plasmáticos de los aminoácidos

El método analítico validado para la cuantificación simultánea de los aminoácidos glutamato, taurina, arginina y citrulina en plasma fue utilizado para el análisis de muestras en pacientes con HSA y voluntarios sanos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

10.2.2.1 Glutamato

La concentración plasmática de glutamato (figura 8) en pacientes fue mayor (17.72 ± 1.60 mmol/L) en comparación con la concentración obtenida en los voluntarios sanos (10.10 ± 1.11 mmol/L), estadísticamente significativa (prueba t de Student, * $p < 0.05$).

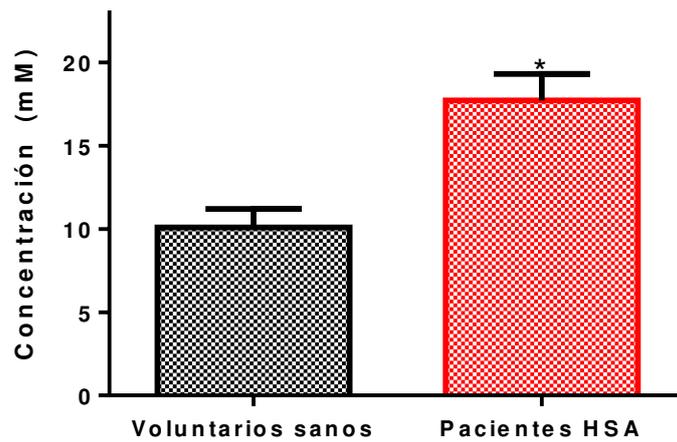


Figura 8. Concentración plasmática de glutamato en pacientes con HSA y voluntarios sanos. Prueba t de Student (* $p < 0.05$, $n = 12$ por grupo).

102.2.2 Glutamina

Adicionalmente, se llevó a cabo la determinación plasmática de glutamina debido a su importancia como reservorio de glutamato. La concentración plasmática de glutamina en pacientes fue de 438.9 ± 28.04 mmol/L y en los voluntarios sanos de 472.4 ± 17.05 mmol/L (figura 9). Dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (prueba t de Student, * $p < 0.05$).

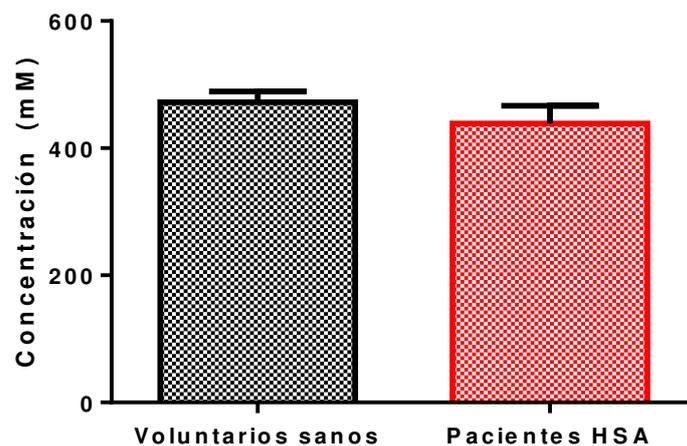


Figura 9. Concentración plasmática de glutamina en pacientes con HSA y voluntarios sanos. No se observó diferencia estadísticamente significativa (* $p < 0.05$, $n = 12$ por grupo).

10.2.2.3 Cociente glutamina/glutamato

Al comparar el cociente concentración de glutamina/cociente de glutamato (figura 10) como una estimación de la proporción de glutamato transformado a glutamina, se observó que en los pacientes fue significativamente menor (24.14 ± 2.44 mmol/L) en comparación con el cociente plasmático de los voluntarios sanos (39.18 ± 6.51 mmol/L), siendo estadísticamente significativo (prueba t de Student, * $p < 0.05$).

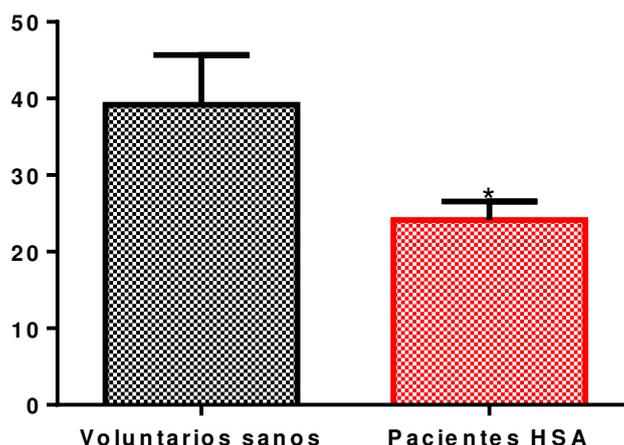


Figura 10. Cociente plasmático concentración de glutamina/concentración de glutamato en pacientes con HSA y voluntarios sanos. Prueba t de Student (* $p < 0.05$, $n = 12$ por grupo).

10.2.2.4 Taurina

La concentración plasmática de taurina (figura 11) en pacientes fue de 53.24 ± 7.34 mmol/L, mientras que en los voluntarios sanos fue de 68.1063 ± 3.61 mmol/L, y aunque se observa una tendencia a la disminución de la concentración de dicho aminoácido en los pacientes, no existe diferencia significativa (prueba t de Student, * $p < 0.05$).

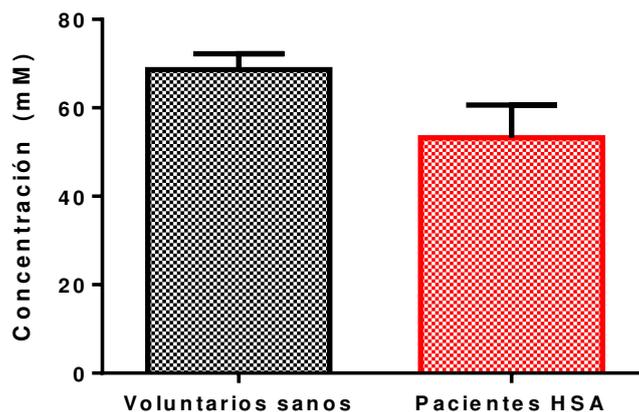


Figura 11. Concentración plasmática de taurina en pacientes con HSA y voluntarios sanos. No se observó diferencia estadísticamente significativa (* $p < 0.05$, $n = 12$ por grupo).

10.2.2.5 Arginina

En la comparación plasmática del aminoácido arginina (figura 12), se observó que la concentración plasmática de este aminoácido fue menor en los pacientes (58.40 ± 4.25 mmol/L) en comparación con los voluntarios sanos (92.90 ± 8.77 mmol/L), mostrando una diferencia con significancia estadística (prueba t de Student, * $p < 0.05$).

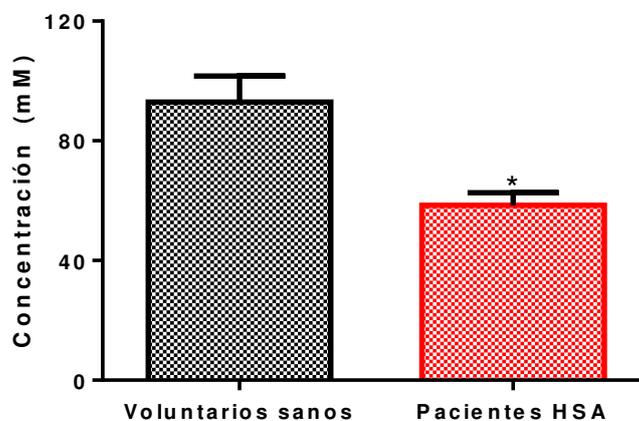


Figura 12. Concentración plasmática de arginina en pacientes con HSA y voluntarios sanos. Prueba t de Student (* $p < 0.05$, $n = 12$ por grupo).

10.2.2.6 Citrulina

En el aminoácido citrulina (figura 13), se observó que la concentración plasmática de este aminoácido en pacientes fue menor (27.09 ± 2.15 mmol/L) en comparación con la concentración plasmática en voluntarios sanos (35.67 ± 1.51 mmol/L), mostrando una diferencia con significancia estadística (prueba t de Student, * $p < 0.05$).

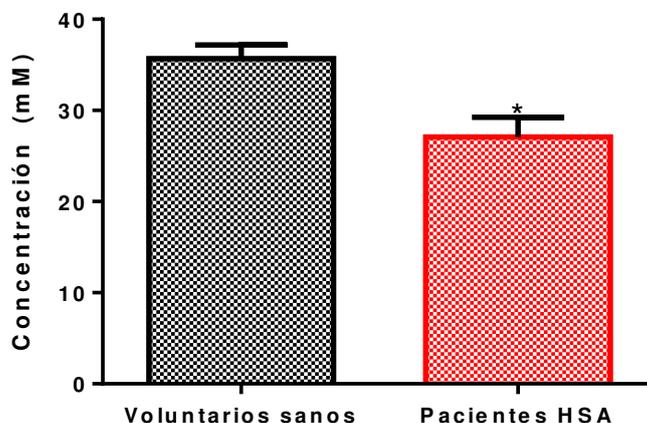


Figura 13. Concentración plasmática de citrulina en pacientes con HSA y voluntarios sanos. Prueba t de Student (* $p < 0.05$, $n = 12$ por grupo).

10.3 Cuantificación plasmática de NOx

Del plasma obtenido de los pacientes y voluntarios sanos, se realizó el análisis de NOx mediante espectrofotometría UV/vis (figura 14). Se encontró que la concentración en pacientes fue menor (31.72 ± 2.50 μ mol/L) en comparación con los voluntarios (46.55 ± 5.95 μ mol/L), siendo estadísticamente significativo (prueba t de Student, * $p < 0.05$).

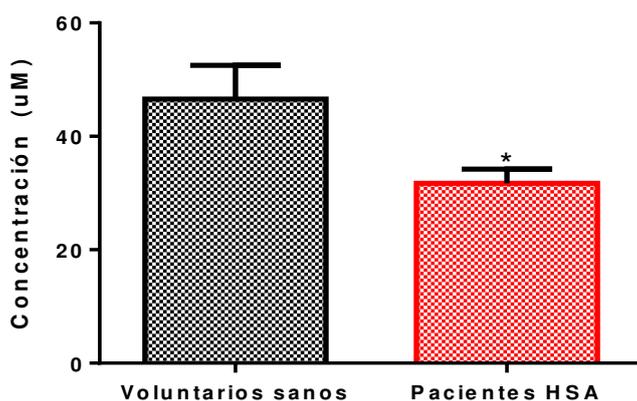


Figura 14. Concentración plasmática de NOx en pacientes con HSA y voluntarios sanos. Prueba t de Student (* $p < 0.05$, $n = 12$ por grupo).

10.4 Caracterización de aminoácidos como posibles biomarcadores

10.4.1 Estudio de correlación

Para determinar el poder predictivo de los aminoácidos como biomarcadores de pronóstico en pacientes con HSA, se llevó a cabo el estudio de correlación de las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos de interés y NOx con el puntaje de las escalas de evaluación clínica inicial Fisher, Hunt & Hess, coma y desenlace Glasgow. En la tabla 17, se muestra el grado de correlación obtenido para cada uno de los aminoácidos con cada una de las escalas clínicas. No se observó correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabla 17. Resultados del análisis de correlación de los aminoácidos con las escalas de evaluación clínica. Se muestra el valor de p obtenido para cada correlación.

Aminoácido	Escalas de evaluación				
	Fisher	Hunt y Hess	Coma Glasgow inicial	Coma Glasgow final (8 meses)	Desenlace Glasgow
	Significancia estadística (p)				
Citrulina	0.851	0.716	0.648	0.413	0.348
Arginina	0.248	0.636	0.640	0.879	0.190
Taurina	0.135	0.334	0.404	0.697	0.716
Glutamato	0.962	0.107	0.730	0.123	0.518
Glutamina	0.342	0.375	0.437	0.781	0.273
Cociente Gln/Glu	0.099	0.567	0.638	0.351	0.763
NOx	0.355	0.158	0.523	0.421	0.471

A pesar de no haber observado correlación estadísticamente significativa, la afectación del estado de consciencia también puede proporcionar un indicio del estado clínico inicial del paciente. Por lo tanto, se graficó y analizó el resultado obtenido de las concentraciones plasmáticas de cada aminoácido, así como de los NOx en pacientes con HSA con el puntaje obtenido en la escala de evaluación clínica coma Glasgow al inicio y a los 8 meses posteriores a su egreso hospitalario, los cuales fueron comparados con las concentraciones plasmáticas de voluntarios sanos.

10.4.2 Niveles plasmáticos de aminoácidos y su relación con el estado de consciencia inicial

La escala de coma Glasgow, es una herramienta de aplicación neurológica que permite establecer el estado de consciencia de una persona mediante la calificación de tres parámetros: apertura ocular, respuesta verbal y respuesta motora. El puntaje más bajo que se puede obtener es 3, y significa pérdida total de la consciencia, un puntaje de 4 a 14 denota una pérdida parcial de la consciencia y, un puntaje de 15 significa que no hay afectación del estado de consciencia. De acuerdo con esta jerarquización, se comparó la concentración plasmática de cada aminoácido, así como de los NOx en pacientes con HSA contra las concentraciones de voluntarios sanos.

10.4.2.1 Glutamato

La concentración plasmática del aminoácido glutamato (figura 15) de acuerdo con el estado de consciencia evaluado con la escala de coma Glasgow, se observó aumentada de manera significativa en aquellos pacientes que ingresaron al hospital con una pérdida parcial de la consciencia. En pacientes que presentaron pérdida total, aunque tuvieron una tendencia al incremento, no mostraron diferencia significativa al ser ambos grupos comparados con los voluntarios sanos (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Dunnett, * $p < 0.05$).

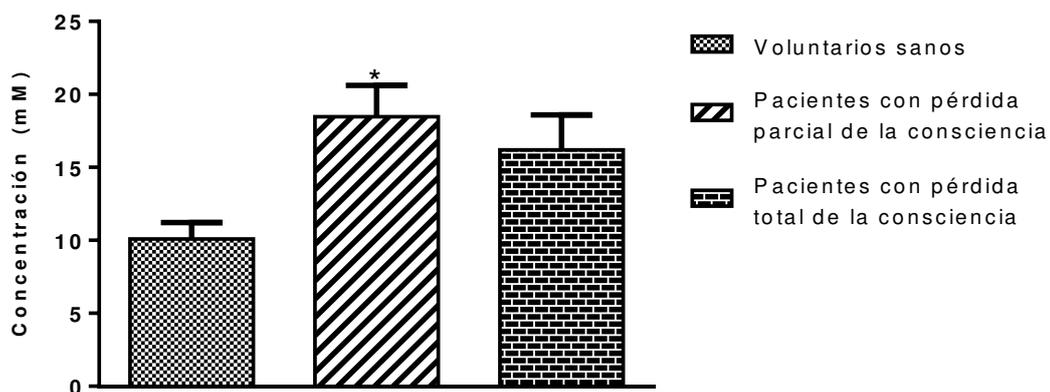


Figura 15. Concentración plasmática de glutamato de acuerdo con el estado de consciencia evaluado mediante la escala de coma Glasgow en pacientes con HSA y voluntarios sanos (sin afectación de la consciencia como grupo comparativo). ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett. (* $p < 0.05$).

10.4.2.2 Glutamina

Al comparar las concentraciones plasmáticas del aminoácido glutamina de los pacientes con pérdida parcial o total del estado de consciencia con respecto a la concentración de los voluntarios sanos (figura 16), no se observó ninguna diferencia significativa (ANOVA de una vía, * $p < 0.05$).

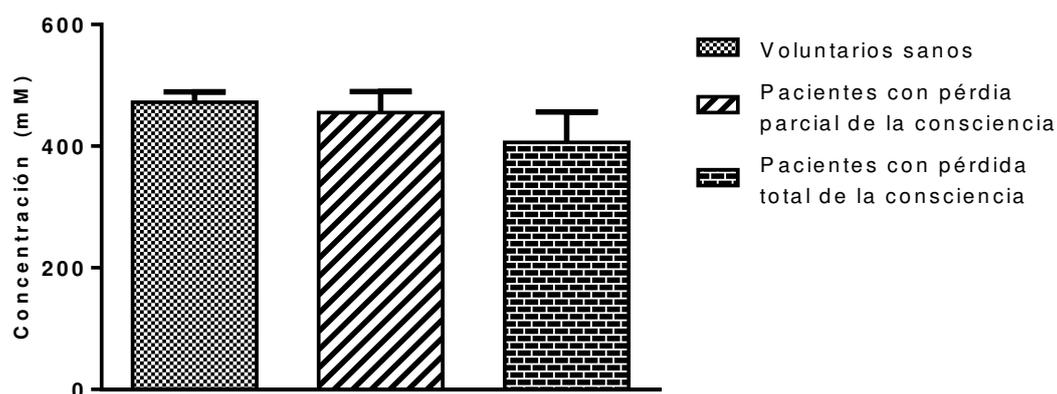


Figura 16. Concentración plasmática de glutamina de acuerdo con el estado de consciencia evaluado mediante la escala de coma Glasgow en pacientes con HSA y voluntarios sanos. No se observó diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía (* $p < 0.05$).

10.4.2.3 Cociente glutamina/glutamato

Al comparar los cocientes promedio de la concentración de glutamina/concentración de glutamato de los pacientes con los voluntarios sanos (figura 17), se observa una tendencia a la disminución de dicho cociente en los pacientes con pérdida parcial o total de la consciencia; sin embargo, no fue estadísticamente significativo (ANOVA de una vía, * $p < 0.05$).

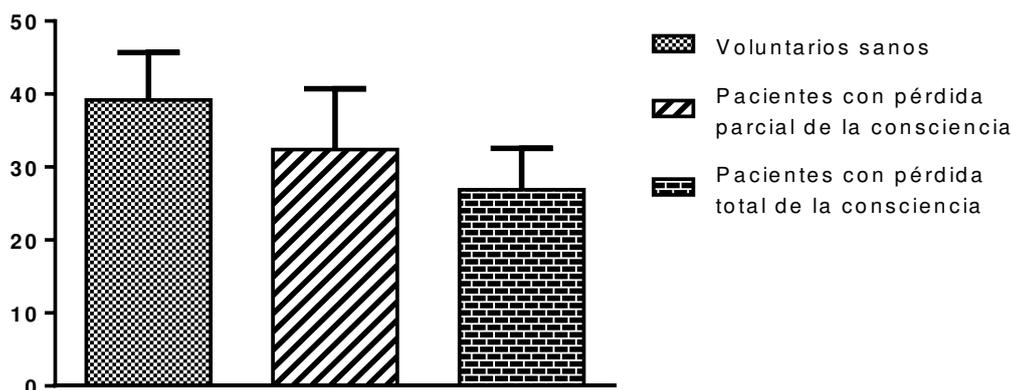


Figura 17. Concentración plasmática del cociente glutamina/glutamato de acuerdo con el estado de consciencia evaluado mediante la escala de coma Glasgow en pacientes con HSA y voluntarios sanos. No se observó diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía. (* $p < 0.05$).

10.4.2.4 Taurina

La concentración plasmática de taurina (figura 18), se encontró disminuida de manera estadísticamente significativa en aquellos pacientes que mostraron una pérdida parcial de la consciencia; sin embargo, en los pacientes que mostraron la pérdida total de la consciencia, se observó una concentración similar a la determinada en los voluntarios sanos (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Dunnett, * $p < 0.05$).

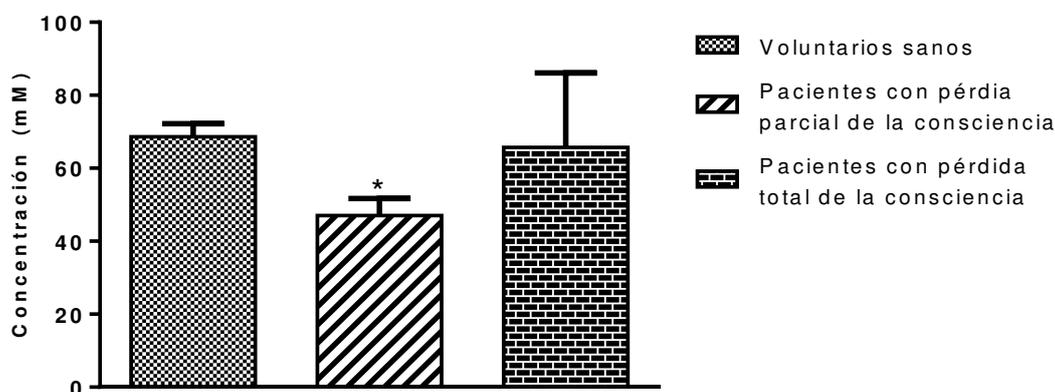


Figura 18. Concentración plasmática de taurina de acuerdo con el estado de consciencia evaluado mediante la escala de coma Glasgow en pacientes con HSA y voluntarios sanos (sin afectación de la consciencia como grupo comparativo). ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett. (* $p < 0.05$).

10.4.2.5 Arginina

En la comparación del aminoácido arginina (figura 19), se observó una disminución significativa en la concentración plasmática encontrada tanto en los pacientes con pérdida parcial de la consciencia, así como en los pacientes que mostraron pérdida total al ser comparados con el grupo de voluntarios sanos (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Dunnett, * $p < 0.05$).

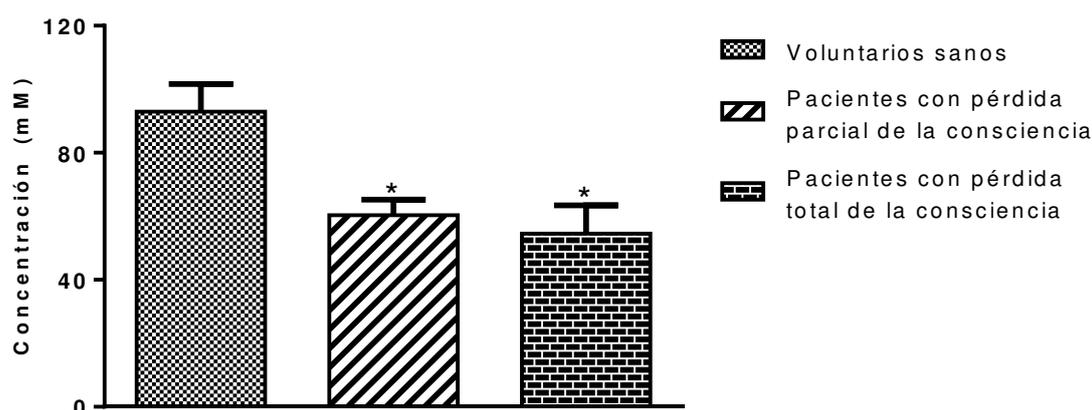


Figura 19. Concentración plasmática de arginina de acuerdo con el estado de consciencia evaluado mediante la escala de coma Glasgow en pacientes con HSA y voluntarios sanos (sin afectación de la consciencia como grupo comparativo). ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett. (* $p < 0.05$).

10.4.2.6 Citrulina

En los pacientes que ingresaron al hospital con una pérdida parcial de la consciencia, pudo observarse una disminución significativa en la concentración plasmática de citrulina con respecto a la concentración del grupo de voluntarios sanos (figura 20); sin embargo, en aquellos que a su ingreso mostraron una pérdida total de la consciencia, no alcanzaron significancia en su disminución con respecto al grupo de voluntarios (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Dunnett, * $p < 0.05$).

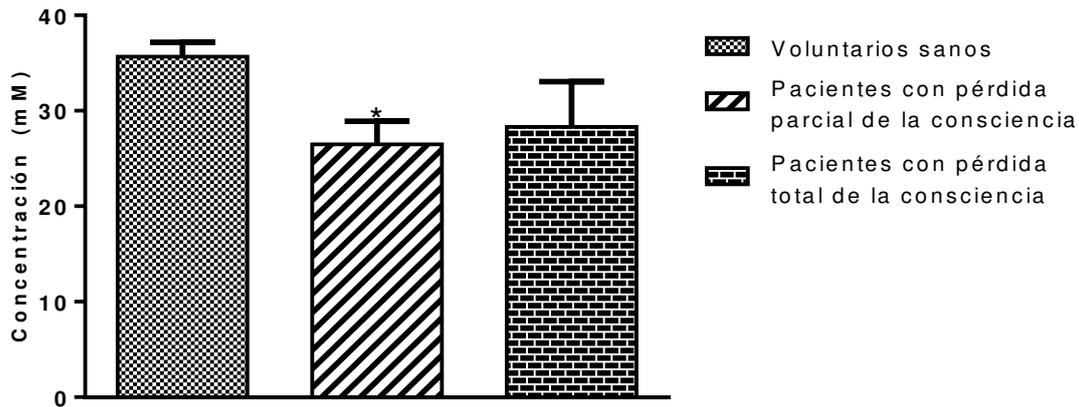


Figura 20. Concentración plasmática de citrulina de acuerdo con el estado de consciencia evaluado mediante la escala de coma Glasgow en pacientes con HSA y voluntarios sanos (sin afectación de la consciencia como grupo comparativo). ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett (* $p < 0.05$).

10.4.2.7 Nitratos/nitritos (NOx)

En el análisis de NOx (figura 21), se observó una disminución estadísticamente significativa en el grupo de pacientes con pérdida parcial de la consciencia al ser comparados con voluntarios sanos que no presentaron afectación de la consciencia. Aunque los pacientes con una pérdida total mostraron una tendencia a disminuir la concentración plasmática del aminoácido, no existió significancia estadística con respecto a los voluntarios sanos (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Dunnett, * $p < 0.05$).

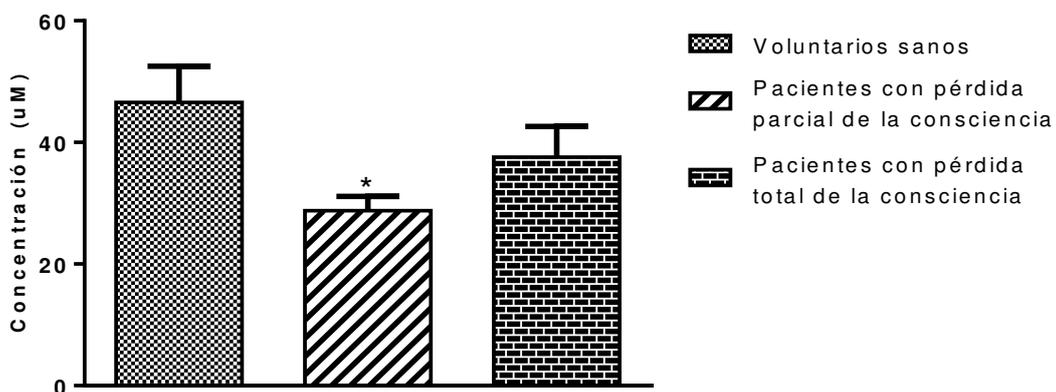


Figura 21. Concentración plasmática de NOx de acuerdo con el estado de consciencia evaluado mediante la escala de coma Glasgow en pacientes con HSA y voluntarios sanos (sin afectación de la consciencia como grupo comparativo). ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett (* $p < 0.05$).

10.4.3 Niveles plasmáticos de aminoácidos y su relación con el estado de consciencia 8 meses después del egreso hospitalario

La aplicación de la escala de coma Glasgow en exploraciones repetidas permite realizar un seguimiento de las fluctuaciones del estado de consciencia, por lo tanto 8 meses después del egreso hospitalario, los pacientes o sus cuidadores fueron contactados mediante una llamada telefónica para su aplicación por segunda ocasión. El puntaje obtenido se jerarquizó nuevamente en pérdida total de la consciencia, pérdida parcial o sin afectación del estado de consciencia, y de acuerdo con esta categorización, se comparó la concentración plasmática de aminoácidos y NOx de pacientes con HSA que se determinó con la muestra obtenida al ingreso hospitalario contra las concentraciones plasmáticas de los voluntarios sanos.

10.4.3.1 Glutamato

Al realizar la comparación de la concentración plasmática del aminoácido glutamato (figura 22), se observó un aumento estadísticamente significativo en los pacientes con pérdida parcial de la consciencia con respecto al grupo de voluntarios, mientras que los pacientes que no mostraron ningún compromiso de su estado de consciencia 8 meses después del evento hemorrágico, la concentración promedio del aminoácido fue similar a la del grupo de voluntarios sanos (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Dunnett, * $p < 0.05$).

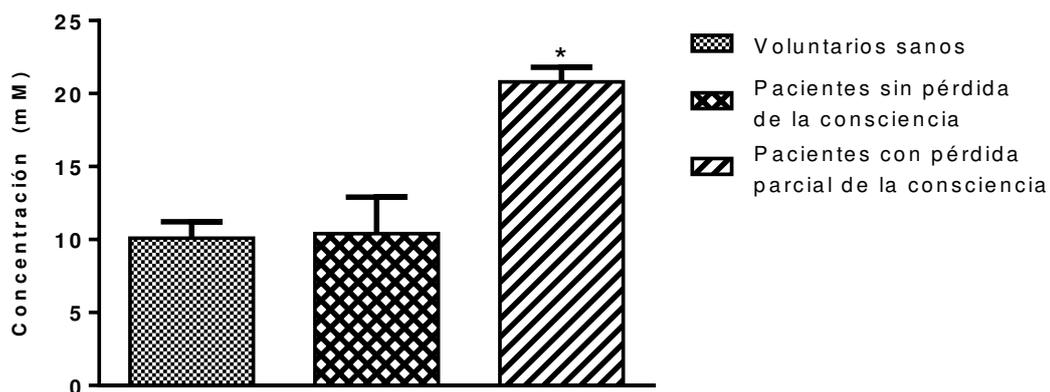


Figura 22. Concentración plasmática de glutamato de acuerdo con el estado de consciencia evaluado 8 meses después del egreso hospitalario mediante la escala de coma Glasgow en pacientes con HSA y voluntarios sanos (sin afectación de la consciencia como grupo comparativo). ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett (* $p < 0.05$).

10.4.3.2 Glutamina

La concentración plasmática del aminoácido glutamina (figura 23), no fue diferente estadísticamente al realizar la comparación entre los pacientes completamente conscientes, aquellos con una pérdida parcial de la consciencia y los voluntarios sanos (ANOVA de una vía, * $p < 0.05$).

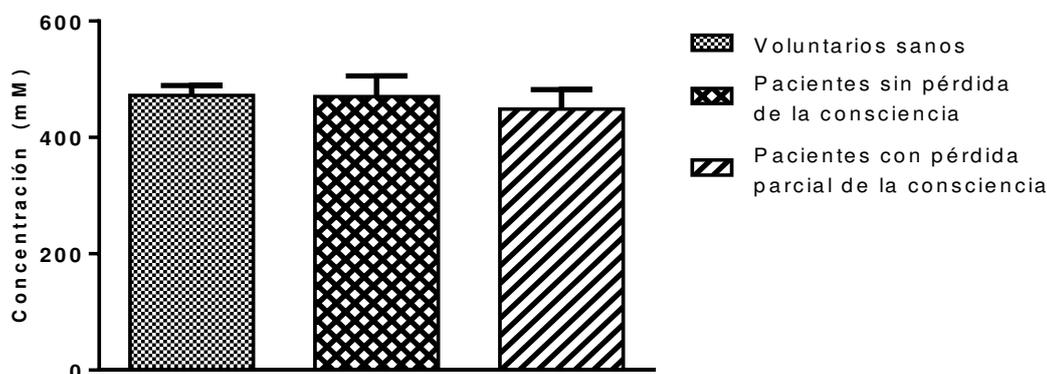


Figura 23. Concentración plasmática de glutamina de acuerdo con el estado de consciencia evaluado 8 meses después del egreso hospitalario mediante la escala de coma Glasgow en pacientes con HSA y voluntarios sanos. No se observó diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía (* $p < 0.05$).

10.4.3.3 Cociente glutamina/glutamato

Al analizar los resultados obtenidos del cociente plasmático glutamina/glutamato (figura 24), no se observó diferencia estadísticamente significativa al comparar los grupos de pacientes con o sin compromiso del estado de consciencia con respecto a los voluntarios sanos (ANOVA de una vía, * $p < 0.05$).

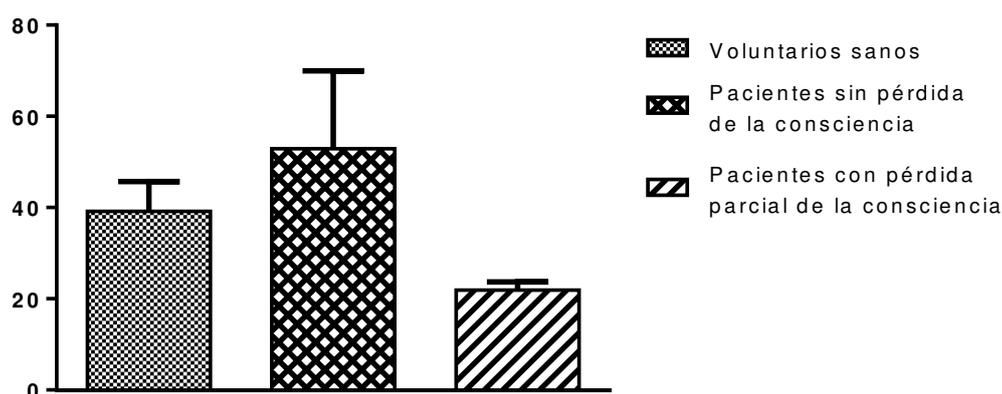


Figura 24. Concentración plasmática del cociente glutamina/glutamato de acuerdo con el estado de consciencia evaluado 8 meses después del egreso hospitalario mediante la escala de coma

Glasgow en pacientes con HSA y voluntarios sanos. No se observó diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía (* $p < 0.05$).

10.4.3.4 Taurina

En la concentración plasmática del aminoácido taurina (figura 25), no se observaron diferencias significativas al realizar la comparación entre los grupos de pacientes con o sin compromiso del estado de consciencia con la concentración observada en los voluntarios sanos (ANOVA de una vía, * $p < 0.05$).

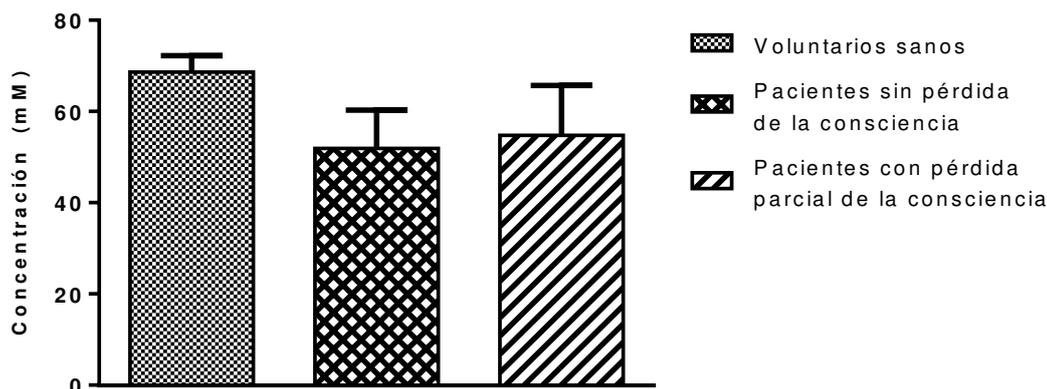


Figura 25. Concentración plasmática de taurina de acuerdo con el estado de consciencia evaluado 8 meses después del egreso hospitalario mediante la escala de coma Glasgow en pacientes con HSA y voluntarios sanos. No se observó diferencia estadísticamente significativa ANOVA de una vía (* $p < 0.05$).

10.4.3.5 Arginina

Con respecto a la concentración del aminoácido arginina (figura 26), se observó una disminución estadísticamente significativa en la concentración plasmática de pacientes con pérdida parcial de la consciencia y, sin embargo, en pacientes conscientes no hubo diferencia en la concentración observada al ser comparada con la obtenida en el grupo de voluntarios sanos (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Dunnett, * $p < 0.05$).

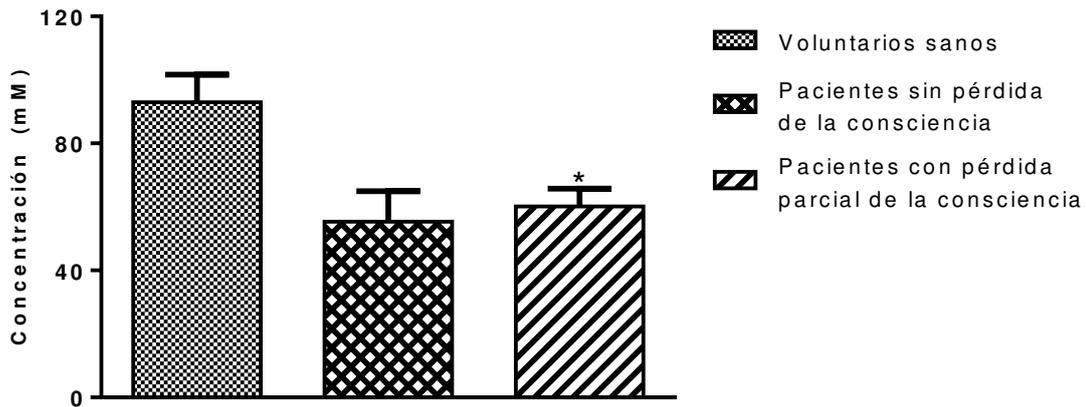


Figura 26. Concentración plasmática de arginina de acuerdo con el estado de consciencia evaluado 8 meses después del egreso hospitalario mediante la escala de coma Glasgow en pacientes con HSA y voluntarios sanos (sin afectación de la consciencia como grupo comparativo). ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett (* $p < 0.05$).

10.4.3.6 Citrulina

Al realizar la comparación de la concentración plasmática del aminoácido citrulina (figura 27), se observó una disminución estadísticamente significativa en aquellos pacientes con una pérdida parcial de la consciencia y no así en pacientes conscientes al ser comparados con el grupo de voluntarios sanos (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Dunnett, * $p < 0.05$).

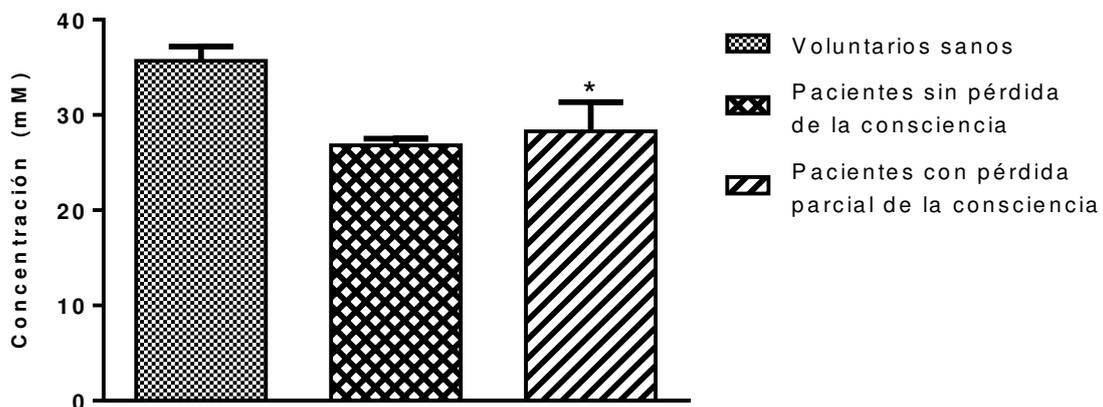


Figura 27. Concentración plasmática de citrulina de acuerdo con el estado de consciencia evaluado 8 meses después del egreso hospitalario mediante la escala de coma Glasgow en pacientes con HSA y voluntarios sanos (sin afectación de la consciencia como grupo comparativo). ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett (* $p < 0.05$).

10.4.3.7 Nitratos/nitritos (NOx)

Al realizar el análisis de los datos de la determinación plasmática de NOx (figura 28), se observó una disminución estadísticamente significativa en el grupo de pacientes que conservaban una pérdida parcial de la consciencia 8 meses después del evento con respecto al grupo de voluntarios. Aquellos pacientes que no mostraron compromiso alguno de su estado de consciencia en la última aplicación de la escala de coma Glasgow, a pesar de mostrar una tendencia a la disminución, ésta no fue con respecto a los voluntarios (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Dunnett, * $p < 0.05$).

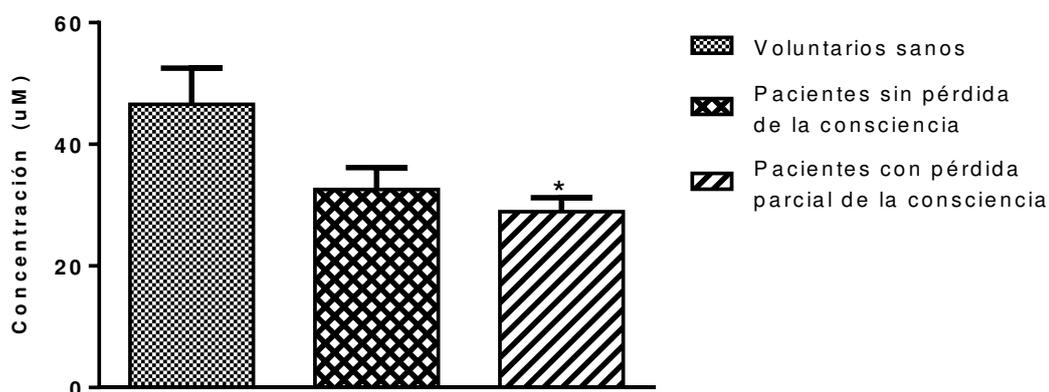


Figura 28. Concentración plasmática de NOx de acuerdo con el estado de consciencia evaluado 8 meses después del egreso hospitalario mediante la escala de coma Glasgow en pacientes con HSA y voluntarios sanos (sin afectación de la consciencia como grupo comparativo). ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett (* $p < 0.05$).

XI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

11.1 Validación del método cromatográfico para la cuantificación de aminoácidos

El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos glutamato, taurina, arginina y citrulina como posibles biomarcadores de pronóstico en pacientes con HSA. Para ello, fue importante garantizar la correcta medición de estos aminoácidos a través de la validación del método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia (CLAR-DFL) bajo los lineamientos establecidos en la NOM-177-SSA1-2013, cuya aplicabilidad es obligatoria para el análisis de muestras biológicas en territorio nacional.

Los aminoácidos son moléculas carentes de fluorescencia intrínseca; sin embargo, la CLAR-DFL ha sido una de las técnicas más empleadas para su determinación debido a que estos analitos son capaces de reaccionar químicamente con moléculas específicas (derivatización) que pueden detectarse fácilmente mediante un detector de fluorescencia, y separarse por una columna de fase reversa en tiempos de retención específicos (Perucho *et al.*, 2015). El agente más utilizado y aceptado para la derivatización fluorescente de aminoácidos precolumna, es el o-ftalaldehído (OPA) en presencia del 2-mercaptoetanol (2-MER), ambos compuestos reaccionan fácilmente con grupos amino para formar derivados isoindoles (figura 29), productos altamente fluorescentes cuando se encuentran en exceso de tioles (Molnar-Perl, 2001; Frank & Powers, 2007; Hacko *et al.*, 2007). Las longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}) empleadas para la monitorización de la fluorescencia generalmente oscilan en un intervalo de 200 a 360 nm y 420 a 455 nm respectivamente, las cuales dependen del equipo y columna cromatográfica utilizada por cada autor (Molnar-Perl, 2011).

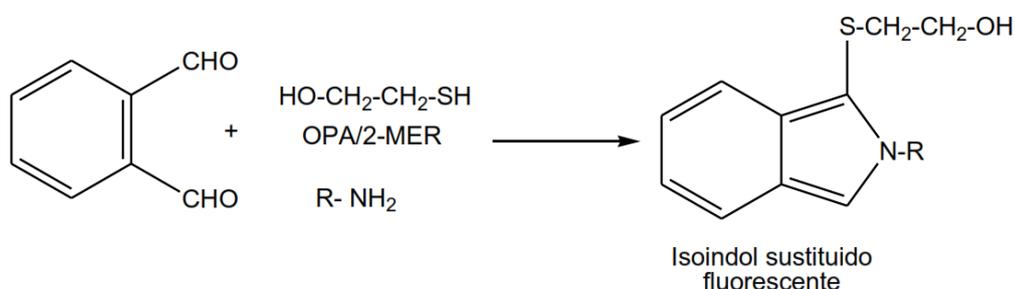


Figura 29. Reacción de derivatización fluorescente de aminoácidos con OPA/2MER.

La metodología de CLAR-DFL con OPA/2MER se ha empleado para la determinación de aminoácidos en muestras biológicas tales como plasma, líquido cefalorraquídeo e incluso tejido (Barges-Coll *et al.*, 2013; Alkaitis *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016; Cui *et al.*, 2017). La adaptación a un nuevo laboratorio de trabajo implica demostrar que cumple con el objetivo para el que fue desarrollado mediante su comprobación a través de una validación analítica, la cual consistió en realizar una serie de procedimientos que demostraron la reproducibilidad y confiabilidad del método bajo los criterios y requisitos establecidos en la normatividad mexicana (NOM-177-SSA1-2013). En el parámetro de selectividad, se evaluó la capacidad del método para diferenciar y cuantificar los analitos de interés en presencia de compuestos endógenos que pudieran estar presentes en la muestra biológica. Para ello, se compararon los tiempos de retención (t_R) de los aminoácidos evaluados, los cuales fueron los siguientes: glutamato de 3.8-4.1 min, citrulina 6.9-7.3 min, arginina 7.4-7.6 min y taurina 10.6-10.9 min del cromatograma correspondiente a la muestra (figura 6) con el cromatograma obtenido en solución acuosa (figura 5). Además de observar que los t_R corresponden a cada uno de los analitos, no se observaron interferencias de otros picos en los t_R correspondiente a cada aminoácido, los cuales fueron cuantificados con precisión y exactitud, indicando que el método es específico para su análisis.

Al evaluar la linealidad del método, los coeficientes de determinación (r^2) obtenidos en el intervalo de trabajo de 1 μM a 80 μM fueron de 0.9998 para glutamato, 0.9999 para citrulina, 0.9998 para arginina y 0.9983 para taurina (tabla 9). Adicionalmente, la concentración recuperada en cada punto evaluado de la curva de calibración se encontró dentro del 20% del intervalo de variación con respecto a la concentración nominal para el punto más bajo de la curva y del 15% para los demás niveles (tabla 10). De esta manera se demostró que el método es lineal, es decir que la señal generada por el detector de fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de los analitos de interés dentro del intervalo de trabajo establecido.

El límite inferior de cuantificación (LIC) se evaluó con el punto más bajo de la curva de calibración (1 μ M), obteniendo un CV menor al 20% en la concentración recuperada para cada aminoácido de interés, demostrando que dicha concentración puede cuantificarse con precisión y exactitud.

Los parámetros de precisión y exactitud se evaluaron intra e interdía mediante las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad expresadas en forma de porcentaje del coeficiente de variación (%CV) y en porcentaje de desviación absoluta con respecto a la concentración nominal respectivamente.

Los resultados de precisión y exactitud de la prueba de repetibilidad se muestran en las tablas 11 y 12, y en las tablas 13 y 14 los correspondientes a la prueba de reproducibilidad. El método es preciso y exacto tanto intradía como interdía, ya que los CV y los % de desviación fueron $\leq 20\%$ para el LIC, así como $\leq 15\%$ para las MCB, MCM y MCA bajo las mismas condiciones de trabajo realizadas en un solo día de análisis (tablas 11 y 12) como en tres diferentes días (tablas 13 y 14). Lo anterior demuestra que los errores aleatorios y sistemáticos que pudieron estar presentes en la ejecución del método no afectan su desempeño ni la confiabilidad de los resultados que se pueden obtener a través de este, indicando que el método es adecuado para la cuantificación de los aminoácidos de interés.

Las pruebas de estabilidad se evaluaron con base en las condiciones de trabajo y de almacenamiento de las muestras plasmáticas. Los resultados de la tabla 15, muestran que los aminoácidos de interés fueron estables al permanecer en automuestreador a temperatura ambiente durante 24 horas y en los datos de la tabla 16, se demuestra la estabilidad de los analitos a una temperatura de almacenamiento de -20°C evaluada durante 60 días. Estos resultados muestran que los aminoácidos no se degradaron, conservando sus características durante su almacenamiento, es decir desde el momento del muestreo hasta su respectivo análisis cromatográfico, incluyendo el tiempo de la corrida analítica.

11.2 Determinación de aminoácidos en plasma

Una vez concluida la validación del método analítico, éste se utilizó para la cuantificación de aminoácidos de 12 muestras plasmáticas provenientes de pacientes con HSA (7 mujeres y 5 hombres con una edad promedio de 53.91 ± 4.84 años) y 12 muestras de voluntarios sanos (5 mujeres y 7 hombres, edad promedio de 42.58 ± 3.45 años). Las concentraciones de aminoácidos en ambos grupos fueron comparadas con el objetivo de establecer la relevancia de cada analito en la población de estudio.

A partir de los resultados del análisis, se detectó un aumento en la concentración plasmática de glutamato en los pacientes con HSA en comparación con los voluntarios sanos (figura 8). Estos resultados concuerdan con otros estudios realizados en pacientes con accidente vascular cerebral, en los que se informa que este aminoácido es un potente predictor de la lesión durante la fase aguda (Castillo *et al.*, 1997; Aliprandi *et al.*, 2005). También, en modelos animales se ha observado el aumento de glutamato aunado a una disminución de su transportador GLT-1 (Yang *et al.*, 2014). El aumento en la concentración de glutamato puede deberse al proceso isquémico resultante tras un evento de HSA, el cual conduce a la alteración de los procesos energéticos que son indispensables para la homeostasis del cerebro. Las bombas disfuncionales de iones dependientes de ATP desequilibran la homeostasis de los iones sodio, calcio y potasio, liberando de forma excesiva glutamato en sitios sinápticos y extrasinápticos (Farooqui *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2014; Sahu *et al.*, 2017). Una vez que se libera glutamato al espacio sináptico, éste es transportado a los astrocitos para reciclar el grupo amino mediante su reacción con el amoníaco y formar glutamina a través de la enzima glutamina sintetasa, la cual se convierte nuevamente a glutamato en la neurona por acción de la glutaminasa, formando el ciclo de la glutamina, cuya acción es la regulación metabólica del glutamato (Siegel *et al.*, 2005). Debido a esta función como reservorio, se propuso la determinación de glutamina en los pacientes y sujetos sanos como un indicador adicional. Se encontró que la concentración plasmática de glutamina tanto en pacientes como en los voluntarios fue similar, no se observó una diferencia significativa (figura 9). Este resultado probablemente se debe al proceso isquémico que se favorece al comienzo del evento hemorrágico, el cual resulta en la liberación excesiva de glutamato y en la disminución de la actividad de su transportador en las células gliales (GLT-1), tal como se ha reportado

en modelos animales (Yang *et al.*, 2014). Por otra parte, en estudios de microdiálisis realizados en pacientes con HSA en los que se cuantificó glutamina mediante CLAR-DL, se reportó un aumento de este aminoácido al final del muestreo de 112 horas, probablemente como consecuencia de una liberación y captación lenta desde el espacio intersticial, la cual depende en gran medida, de los gradientes de concentración a través de las membranas celulares de las neuronas y astrocitos (Samuelsson *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2013).

El ciclo de la glutamina representa aproximadamente el 40% de la tasa de recambio de glutamato, lo que significa que casi la mitad de este aminoácido formado en las neuronas se transfiere a las células gliales (Siegel *et al.*, 2005). La relación plasmática glutamina/glutamato (Gln/Glu), se puede tomar como una estimación del glutamato convertido a glutamina (Samuelsson *et al.*, 2007). En los resultados de este trabajo la relación Gln/Glu se encontró disminuida en los pacientes (figura 10), denotando una disminución en la conversión de glutamato a glutamina. La interconversión Gln/Glu es regulada por la acción de dos enzimas, la glutamina sintetasa dependiente de ATP expresada por células gliales y la glutaminasa, una enzima mitocondrial presente principalmente en las neuronas (Broer & Brookes, 2001; Krajewski *et al.*, 2008). Por lo tanto, también podría ser posible que la disminución observada en la relación Gln/Glu se deba al desequilibrio de la actividad de estas enzimas, tal como se observó en un estudio de evaluación de metabolitos cerebrales en pacientes con HSA (Wagner *et al.*, 2013).

Por otra parte, la taurina es un osmolito orgánico que se encuentra implicado en la hinchazón astrocitaria observada en el edema cerebral tras un evento de HSA, ya que regula el volumen neuronal mediante su absorción o liberación al espacio extracelular (Barges-Coll *et al.*, 2013). En comparación con los niveles plasmáticos de los sujetos sanos, en nuestro estudio se observó una tendencia no significativa a la disminución de su concentración en los pacientes (figura 11). Esto probablemente podría indicar que los pacientes no presentaron edema cerebral al momento de la toma de muestra, ya que en un estudio de seguimiento realizado en pacientes con HSA no se observó un cambio significativo en la concentración de taurina extracelular durante las primeras horas del

evento, incluso durante los primeros tres días (Zetterling *et al.*, 2009). Otra explicación podría estar relacionada con la respuesta adaptativa que tiene la neurona sobre la formación del edema, debido a que la movilización de osmolitos es inicialmente de K^+ y Cl^- durante las primeras horas, seguido de la disminución gradual de los osmolitos orgánicos (Pasantes *et al.*, al 2002), existiendo una relación inversa entre las concentraciones de taurina y de K^+ (Barges *et al.*, 2013).

El óxido nítrico (NO) además de ser la principal molécula vasodilatadora del organismo, mantiene la función endotelial inhibiendo la agregación plaquetaria y adhesión leucocitaria (Iqbal *et al.*, 2016). El NO se produce a partir del aminoácido L-arginina mediante una reacción catalizada por la sintasa del NO (NOS), formando NO y citrulina en cantidades equimolares (Pérez-Neri, 2015). Sin embargo, es una molécula difícil de cuantificar debido a su corta vida media en sistemas biológicos (alrededor de 10 s, o hasta 50 s), por esto, tanto la arginina como citrulina se pueden utilizar como marcadores de la síntesis del óxido nítrico (Ellis *et al.*, 1998). En los resultados de este proyecto se encontraron disminuidas las concentraciones plasmáticas de arginina y citrulina en los pacientes (figuras 12 y 13 respectivamente). Este comportamiento se ha informado en pacientes con episodio de apoplejía en los que existen niveles bajos de arginina plasmática (Koga *et al.*, 2010), así como en aquellos que presentan enfermedades mitocondriales donde la producción de ATP se deteriora al igual que en el evento hemorrágico para llevar a cabo la síntesis de citrulina (Naini *et al.*, 2005). Respecto a los marcadores de la actividad de la NOS, los nitratos y nitritos (NOx) son utilizados con mayor frecuencia en estudios *in vivo* como un índice de producción de NO en todo el organismo debido al equilibrio dinámico que presenta con todos los órganos y fluidos intersticiales (Giustarini *et al.*, 2008). En su determinación, se observó una disminución de NOx plasmática en los pacientes (figura 14). Como se ha mencionado, el ensayo de NOx es un indicativo indirecto del NO, cuya producción puede ser catalizada por tres isoformas de la NOS, dos de ellas se expresan de forma constitutiva por células endoteliales y neuronales (NOSn y NOSe) y una inducida (NOSi) por células que participan en la respuesta inmune, entre ellos macrófagos, microglía y astrocitos (Pérez-Neri, 2015). Tras un evento de HSA, se produce un aumento en la presión intracraneal

provocando un vasoespasmo, la formación de éste, se asocia con una reducción del 40% en la producción de NO en células endoteliales y neuronales (Iqbal, 2016). La disminución del NO también puede deberse a la liberación de hemoglobinas ferrosas (oxihemoglobina, oxi-Hb y desoxihemoglobina) que, tras la extravasación de los eritrocitos, eliminan el NO en circulación, incluso la oxi-Hb promueve la muerte de neuronas que expresan la NOSn. Las hemoglobinas ferrosas que eliminan al NO, se oxidan a metahemoglobina y posteriormente se transforma a bilirrubina y biliverdina por acción de la hemo oxigenasa, que a su vez favorece la síntesis de inhibidores endógenos de NOSe como la dimetil arginina simétrica y se promueve la expresión de la NOSi (Pluta, 2008).

Adicionalmente en este trabajo, se registró el grado Fisher, Hunt & Hess y coma Glasgow de los pacientes al ingreso hospitalario, ya que se ha reportado que aquellos pacientes que muestran déficits neurológicos severos al inicio del evento hemorrágico (grados IV y V en Hunt & Hess principalmente, III y IV en Fisher), tienen un mal desenlace clínico, y sorprendentemente los pacientes con un déficit neurológico menor (grados I y II de las escalas Fisher y Hunt & Hess) también pueden mostrar un desenlace clínico desfavorable sin una causa determinada (van der Berg *et al.*, 2011; Vergouwen *et al.*, 2011). En nuestros resultados, aproximadamente el 60% de los pacientes presentaron un buen pronóstico inicial según la escala de coma Glasgow.

Posteriormente, 8 meses después del egreso hospitalario, se investigó nuevamente el valor de coma Glasgow y en adición, se evaluó la escala de desenlace Glasgow, una herramienta que estratifica la funcionalidad del paciente mediante la evaluación longitudinal de la gravedad de la consciencia provocada por la lesión traumática, y que sirve de apoyo al pronóstico (Udekwu *et al.*, 2004). El resultado obtenido bajo este criterio fue que inicialmente el 90% de los pacientes presentó un buen estado clínico, particularmente con un puntaje ≥ 13 en la escala de coma Glasgow, es decir, no presentaron compromiso de su estado de consciencia, y respecto a la escala de desenlace Glasgow, aproximadamente el 73% presentó discapacidad moderada a buena recuperación, es decir, la mayoría de los pacientes presentan independencia dentro del

hogar, así como la capacidad de realizar algunas actividades fuera de éste con el acompañamiento de algún cuidador (Wilson *et al.*, 1998).

Una vez establecida tanto la relevancia de los aminoácidos al inicio de la HSA como el estado inicial y desenlace clínico de los pacientes a través de las diferentes escalas mencionadas anteriormente, se llevó a cabo la asociación de ambas variables mediante un estudio de correlación estadística con el fin de determinar el poder predictivo de dichos analitos como posibles biomarcadores de pronóstico. En nuestro estudio ninguno de los aminoácidos mostró correlación significativa con ninguna de las escalas de evaluación tanto inicial como de desenlace (tabla 17). Si bien, se ha reportado que el glutamato y el NO se encuentran relacionados con el vasoespasma y la isquemia cerebral tardía en pacientes con HSA (Jung *et al.*, 2013; Burrell *et al.*, 2016), y que taurina es un indicativo de la formación de edema cerebral en esta enfermedad (Barges-Coll *et al.*, 2013), esto ocurre principalmente en aquellos pacientes que presentan un mal pronóstico clínico inicial, o bien un desenlace clínico desfavorable.

En este tipo de estudios, el estado de consciencia también ha demostrado ser un parámetro en la predicción del resultado mediante la inclusión de factores intermedios (Kazumata *et al.*, 2006). La escala de coma Glasgow, es la herramienta que se utiliza para evaluar el estado de consciencia, el cual se puede clasificar en pérdida total, parcial o sin afectación de ésta. Por lo tanto, adicionalmente se procedió a realizar el análisis comparativo de las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos que fueron determinados con la muestra obtenida al ingreso hospitalario, con respecto al estado de consciencia tanto inicial (el día de ingreso hospitalario) y a los 8 meses posteriores de su egreso, y de esta forma, demostrar el posible impacto que pueden tener estos aminoácidos sobre el estado de consciencia. En nuestros resultados, los pacientes con pérdida parcial del estado de consciencia mostraron un aumento significativo en la concentración plasmática de glutamato, y a pesar de que la concentración de este aminoácido en los pacientes inconscientes no fue significativa, se observa una tendencia a su aumento de acuerdo con los resultados de coma Glasgow iniciales (figura 15). Posteriormente a los 8 meses, se observó mejoría de la consciencia, y esto se reflejó en

la similitud de los niveles de glutamato que presentaron los pacientes conscientes con respecto a los sujetos sanos; sin embargo, se mantuvo el aumento significativo de glutamato en pacientes con pérdida parcial de la consciencia (figura 22). Se ha reportado que la concentración plasmática de este aminoácido se mantiene elevada días después del evento hemorrágico (Aliprandi *et al.*, 2005) probablemente como consecuencia de su implicación en la isquemia cerebral que desemboca en los procesos de excitotoxicidad neuronal (Stefani *et al.*, 2017). Si bien la glutamina se sintetiza a partir de glutamato, de acuerdo con el estado de consciencia inicial, no se observaron cambios en la concentración plasmática de glutamina en los pacientes con HSA (figura 16), y a pesar de la mejoría observada de dicho estado a los 8 meses después de su egreso hospitalario, nuevamente no se presentaron cambios en la concentración plasmática de este aminoácido respecto al nivel de consciencia (figura 23). La síntesis de glutamina se lleva a cabo una vez que el glutamato liberado es transportado a los astrocitos, además de requerir ATP y amoníaco para su formación (Siegel *et al.*, 2005). Las limitantes de la biosíntesis de glutamina incluyen los transportadores de glutamato (GLT-1) hacia las células gliales (Yang *et al.*, 2014), la disminución de ATP durante el proceso isquémico (Farooqui *et al.*, 2008) y su abundancia en el torrente sanguíneo, ya que además de cerebro también se sintetiza en tejido hepático y estomacal (Chaudhry *et al.*, 2016). Además, en estudios realizados con LCR en pacientes con HSA es donde se ha observado cambios en su concentración, específicamente un aumento (Dunne *et al.*, 2005); así que, podríamos argumentar que su análisis en plasma para el estudio de esta enfermedad fue la causa de no observar cambios en su concentración. Por otra parte, al evaluar la relación Gln/Glu con respecto al estado de consciencia inicial, se observó una tendencia a la disminución del cociente en medida que disminuía el estado de consciencia; sin embargo, no fue significativo (figura 17). Posteriormente, con la mejoría del estado de consciencia mediante su evaluación con la escala coma Glasgow a los 8 meses, se observó que la concentración es similar entre los grupos, la cual nuevamente no fue significativa (figura 24). La disminución del cociente observado al principio probablemente sea la consecuencia del aumento de glutamato, ya que indicaría que entre mayor sea este aminoácido, menor sería la proporción que se convierte a glutamina, incluso la tendencia que se observa es con respecto a la pérdida de la consciencia, ya

que posteriormente en la segunda evaluación de Glasgow, al recuperar el estado de conciencia al nivel de los sujetos sanos, no se observó el mismo fenómeno.

En relación con el estado de conciencia presentado al momento del ingreso hospitalario, la concentración plasmática de taurina se encontró disminuida significativamente en pacientes con pérdida parcial de la conciencia (figura 18). Sin embargo, en la evaluación de este mismo parámetro que se llevó a cabo a los 8 meses después, además de observar mejoría en el estado de conciencia, no se observaron diferencias significativas tanto en pacientes conscientes como en aquellos con pérdida parcial de la conciencia, a pesar de existir una tendencia a la disminución en ambos grupos (figura 25). Tal como se mencionó anteriormente, los reportes sugieren que taurina es un indicativo de edema cerebral y al mismo tiempo, un marcador de desenlace clínico desfavorable (Barges-Coll *et al.*, 2013; Kofler *et al.*, 2015; Lantigua *et al.*, 2015); no obstante, en este estudio no se contó con la información para establecer la existencia o no del edema, aunque debido a que la mayoría de los pacientes a los 8 meses presentó mejoría clínica, podría concluirse que no hubo edema; lo que sugiere que la disminución de taurina podría tener su origen en un mecanismo diferente a la formación del edema, para comprobar esta hipótesis se necesita ampliar las variables de estudio y el número de pacientes con diferente grado clínico inicial.

Con respecto a la determinación de arginina y citrulina como marcadores de la síntesis de NO y su relación con la evaluación inicial de conciencia, observamos una disminución similar de arginina en ambos grupos de pacientes (parcialmente conscientes e inconscientes), la cual fue significativa (figura 19). Por otra parte, con respecto a citrulina se observó que los pacientes con pérdida parcial mostraron disminución de este aminoácido, y a pesar de que los pacientes inconscientes presentaron una tendencia a la disminución, la variación no fue estadísticamente significativa (figura 20). Al relacionar estos resultados con los observados con los NOx, se corrobora que el principal grupo afectado fueron aquellos con pérdida parcial de la conciencia (figura 21). Para poder explicar esto, debemos tomar en cuenta que la síntesis de NO depende en gran medida de la disponibilidad de arginina, cuya síntesis también depende de su formación endógena a partir de citrulina (El-Hattab *et al.*, 2012), así como de la expresión de la NOS

(Pérez-Neri, 2005). El agotamiento de energía tras el evento hemorrágico conlleva a una disfunción endotelial que favorece la muerte de neuronas que expresan la NOS neuronal y endotelial, la cual reduce la producción de NO (Pluta, 2008), deficiencias energéticas de ATP mitocondriales que desembocan en la disminución de la síntesis de citrulina para la formación de arginina *de novo* (El-Hattab *et al.*, 2012) mediante la disminución de la actividad en las enzimas argininosuccinato sintetasa (ASS) y de la argininosuccinato liasa (ASL). Además, otros autores han reportado en modelos animales de isquemia que también son expresadas en células gliales a las 72 horas después de la perfusión en conjunto con la NOSi en los animales con menor sobrevivencia (Bizzoco *et al.*, 2007). Como se describió anteriormente, los pacientes con menor puntaje Glasgow mostraron disminución o bien, tendencia a la disminución en la concentración plasmática de estos aminoácidos y de NOx. Por otra parte, en la segunda evaluación de consciencia (8 meses después) se observó en los pacientes con pérdida parcial, disminuye tanto la concentración plasmática de arginina, citrulina como de NOx, y no así en pacientes conscientes a pesar de la tendencia mostrada (figuras 26, 27 y 28 respectivamente), por lo tanto, la disminución de estos marcadores se acentúa en pacientes con menor nivel de consciencia según el puntaje de coma Glasgow.

Con los resultados obtenidos no fue posible demostrar el potencial de glutamato, taurina, arginina y citrulina como biomarcadores de pronóstico en la HSA, ya que estos no tuvieron relevancia sobre el desenlace clínico. No obstante, el aumento de glutamato y la disminución plasmática de arginina y citrulina reflejan la condición clínica inicial del paciente, principalmente cuando el estado de consciencia se encuentra mayormente comprometido, lo cual sugiere que estos aminoácidos pueden tener potencial como biomarcadores de diagnóstico en pacientes con HSA. Para comprobar esta hipótesis, se debe evaluar la inclusión adicional de más pacientes con diferentes grados Fisher, Hunt & Hess y Glasgow, además de llevar a cabo otro análisis plasmático de aminoácidos como seguimiento clínico para poder caracterizar su potencial como biomarcadores de diagnóstico de esta enfermedad.

XII. CONCLUSIONES

- El método desarrollado para la cuantificación simultánea de los aminoácidos de interés fue selectivo, lineal, preciso, exacto, con un límite inferior de cuantificación de 1 μM de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013.
- Las muestras plasmáticas para el análisis de los aminoácidos de interés son estables para su análisis a corto plazo (automuestreador, a temperatura ambiente, durante 24 horas) y largo plazo (-20°C , 60 días) de acuerdo con las condiciones de trabajo establecidas en el protocolo.
- La concentración plasmática de glutamato aumenta en pacientes con HSA en comparación con sujetos sanos.
- Las concentraciones plasmáticas de arginina, citrulina, Gln/Glu y NOx disminuyen en pacientes con HSA en comparación con sujetos sanos.
- Existe una relación de aumento en la concentración plasmática de glutamato en pacientes con HSA que presentaron pérdida parcial de la consciencia al ingreso hospitalario y a los 8 meses después de su egreso hospitalario.
- Las concentraciones plasmáticas de taurina, arginina, citrulina y NOx disminuyen en pacientes con HSA que presentaron pérdida parcial de la consciencia al ingreso hospitalario.
- La concentración plasmática de arginina disminuye en pacientes con HSA que presentaron pérdida total de la consciencia al ingreso hospitalario.
- Las concentraciones plasmáticas de arginina, citrulina y NOx disminuyen en pacientes con HSA que a los 8 meses aún mostraban pérdida parcial de la consciencia de acuerdo con la escala de coma Glasgow.

XIII. PERSPECTIVAS

- Aumentar el número de pacientes con diferentes grados de HSA al estudio para comprobar el potencial de los aminoácidos de interés como posibles biomarcadores de pronóstico.
- Realizar un análisis de seguimiento de las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos evaluados.
- Incluir como variables de estudio la presencia de resangrado, edema y vasoespasmo.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht, J., & Wegrzynowicz, M. (2005). Endogenous neuro-protectants in ammonia toxicity in the central nervous system: facts and hypotheses. *Metab Brain Dis*, 20(4), 253-63.
- Aliprandi, A., Longoni, M., Stanzani, L., Tremolizzo, L., Vaccaro, M., & Ferrarese, C. (2005). Increased plasma glutamate in stroke patients might be linked to altered platelet release and uptake. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25(4), 513-9.
- Alkaitis, M., Nardone, G., Chertow, J., & Ackerman, H. (2016). Resolution and quantification of arginine, monomethylarginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in plasma using HPLC with internal calibration. *Biomed. Chromatogr*, 30, 294-300.
- Anderson, D., & Kodukula, K. (2014). Biomarkers in pharmacology and drug discovery. *Biochemical Pharmacology*, 87, 172-188.
- Arango, S. (2011). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 30(1), 75-82.
- Barallobre-Barreiro, J., Chung, Y., & Mayr, M. (2013). Proteomics and metabolomics for mechanistic insights and biomarker discovery in cardiovascular disease. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 66(8).
- Barges-Coll, J., Pérez-Neri, I., Avedaño, J., Mendez-Rosito, D., Gomez-Amador, J. L., & Ríos, C. (2013). Plasma taurine as a predictor of poor outcome in patients with mild neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg*, 119(4), 1021-7.
- Bederson, J. B., Conolly, E. S., Batjer, H. H., Dacey, R. G., Dion, J. E., & Rosenwasser, R. H. (2009). Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke*, 40(3), 994-1025.
- Bederson, J., Levy, A., Ding, W., Kahn, R., DiPerna, C., Jenkins, A., & Vallabhajosyula, P. (1998). Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 42(2), 352-60.
- Bizzoco, E., Faussonne-Pellegrini, M., & Vannucchi, M. (2007). Activated microglia cells express argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase in the rat brain after transient ischemia. *Exp Neurol*, 208(1), 100-9.
- Bonow, R. H., Silber, J. R., Enzemann, D. R., Beauchamp, N. J., Ellenbogen, R. G., & Mourad, P. D. (2016). Towards use of MRI-guided ultrasound for treating cerebral vasospasm. *J. Ther Ultrasound*, 4(6), 1-8.
- Bornstein, N. M., & Poon, W. S. (2012). Recuperación acelerada de las lesiones cerebrales agudas: eficacia clínica del tratamiento neurotrófico en el ictus y las lesiones encefálicas traumáticas. *Drugs of today*, 48, (Supplement A).
- Broer, S., & Brookes, N. (2001). Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem*, 77, 705-19.
- Burrell, C., Avalon, N., Siegel, J., Pizzi, M., Dutta, T., Charlesworth, C., & Freeman, W. (2016). Precision Medicine of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage – Vasospasm and Delayed Cerebral Ischemia. *Expert Rev Neurother*, 16(11), 1251-62.
- Cabrera, A., Acal, S., Venegas, E., Ramírez, A., Plasencia, O., Núñez, N. & Guzmán, R. (2008). Factores orinósticos en pacientes con hemorragia subaracnoidea por ruptura de aneurisma. *Rev Asoc Mex Med Crit y Ter Int*, 22(4), 221-25.
- Cantú-Brito, C., Ruiz-Sandoval, J., Chiquete, E., Arauz, A., León-Jiménez, C., Murillo-Bonilla, L., & Rangel-Guerrero, R. (2011). Factores de riesgo, causa y pronóstico de los tipos de enfermedad vascular cerebral en México: Estudio RENAMEVASC. *Rev Mex Neuroci*, 12(5), 224-34.

- Cantú-Brito, C., Chiquete Anaya, E., Ruíz Sandoval, J. L., Arauz Góngora, A., Murillo Bonilla, L. M., Barinagarrementería, F., & Villareal, J. (2012). *Enfermedad Vascular Cerebral*. México: PyDESA.
- Cañas, P. (2002). Rol biológico y nutricional de la taurina y sus derivados. *Rev Chil Nutr*, 29(3), 623-27.
- Cardentey-Pereda, A., & Pérez-Falero, R. (2002). Hemorragia subaracnoidea. *Rev Neurol*, 34(10), 954-966.
- Castellanos, M., Sobrino, T., Pedraza, S., Moldes, O., Pumar, J., Castillo, J., & Dávalos, A. (2008). High plasma glutamate concentrations are associated with infarct growth in acute ischemic stroke. *Neurology*, 71(23), 1862-68.
- Castillo, J., Dávalos, A., & Noya, M. (1997). Progression of ischemic stroke and excitotoxic amino acids. *Lancet*, 349, 79-83.
- Chaudhry, K., Shukla, P., Mir, H., Manda, B., Gangwar, R., & Rao, R. (2016). Glutamine supplementation attenuates ethanol-induced disruption of apical junctional complexes in colonic epithelium and ameliorates gut barrier dysfunction and fatty liver in mice. *J Nutr Biochem*, 27, 16-26.
- Claassen, J., Bernardini, G., Kreiter, K., Bates, J., Du, Y., Copeland, D., Mayer, S. y cols. (2001). Effect of cisternal and ventricular blood on risk of delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: the Fisher scale revisited. *Stroke*, 32(9), 2012-20.
- Cui, T., Qiu, H. m., Huang, D., Zhou, Q. x., Fu, X., Li, H., & hui, X. (2017). Abnormal levels of seven amino neurotransmitters in depressed rat brain and determination by HPLC-FLD. *Biomed Chromatogr*, (31) 8.
- Da Silva, I. R., Gomes, J. A., Wachsman, A., de Freitas, G., & Provencio, J. J. (2017). Hematologic counts as predictors of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Crit Care*, 37, 126-129.
- Dancey, J. E., Dobbin, K. K., Groshen, S., Jessup, J. M., Hruszkewycz, A. H., Koehler, M., & Grever, M. R. (2010). Guidelines for the development and incorporation of biomarker studies in early clinical trials of novel agents. *Clin Cancer Res*, 16(6), 1745-55.
- De la Cruz, R., Hidalgo, M., Yan, E., & Vileda, E. (2007). Correlación entre la escala Hunt y Hess y la escala Fischer en la evaluación de la severidad de la hemorragia subaracnoidea aneurismática. Hospital Regional Cayetano. *Acta Méd. Orreguiana Hampi Runa*, 7(1), 37-46.
- Díez-Tejedor, E. (2006). *Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus*. Barcelona: Sociedad Española de Neurología.
- Diringer, M. (2009). Management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Crit Care Med*, 37(2), 432-40.
- Dumont, A., Dumont, R., Chow, M., Lin, C., & Lee, K. (2003). Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: putative role of inflammation. *Neurosurgery*, 53(1), 123-33.
- Dunne, V., Bhattachayya, S., Besser, M., Rae, C., & Griffin, J. (2005). Metabolites from cerebrospinal fluid in aneurysmal subarachnoid haemorrhage correlate with vasospasm and clinical outcome: a pattern-recognition 1H NMR study. *NMR Biomed*, 18(1), 24-33.
- El-Hattab, A., Emrick, L., Craigen, W., & Scaglia, F. (2012). Citrulline and arginine utility in treating nitric oxide deficiency in mitochondrial disorders. *Mol Genet Metab*, 103(7), 247-52.
- El-Hattab, A. W., Emrick, L. T., Chanprasert, S., Craigen, W. J., & Scaglia, F. (2014). Mitochondria: role of citrulline and arginine supplementation in MELAS syndrome. *The International Journal of Biochemistry & cell Biology*, 48, 85-91.
- Ellis, G., Adatia, I., Yazdanpanah, M., & Makela, S. (1998). Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem*, 31(4), 195-220.
- Fernández-Travieso, J. C. (2014). Enfermedad cerebrovascular: incidencia y tratamiento actual. *Revista CENIC Cien Biol*, 5(3), 152-78.

- Farooqui, A. A., Ong, W. Y., & Horrocks, L. A. (2008). *Neurochemical aspects of excitotoxicity*. Nueva York: Springer.
- Fountas, K., Tasiou, A., Kapsalaki, E., Paterakis, K., & Robinson, J. (2009). Serum and cerebrospinal fluid C-reactive protein levels as predictors of vasospasm in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Clinical article. *Neurosurg Focus*, 26(5), E22.
- Frank, M., & Powers, R. (2007). Simple and rapid quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of plasma amino acids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 852(1-2), 646-9.
- Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., & Dalle-Donne, I. (2008). Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. *Methods Enzymol*, 440, 361-80.
- Gonzales-Portillo, C., Ishikawa, H., Shinozuka, K., Tajiri, N., Kaneko, Y., & Borlogan, C. (2016). Stroke and cardiac cell death: Two peas in a pod. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 142, 145-47.
- Gorelick, P. B., & Ruland, S. (2010). Diagnosis and Management of Acute Ischemic Stroke. *Dis Mon*, 56(2), 72-100.
- Hanczko, R., Jambor, A., Perl, A., & Molnal-Perl, I. (2007). Advances in the o-phthalaldehyde derivatizations. Comeback to the o-phthalaldehyde-ethanethiol reagent. *J Chromatogr*, 1163(1-2), 25-42.
- Harder, U., Koletzko, B., & Peissner, W. (2011). Quantification of 22 plasma amino acids combining derivatization and ion-pair LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879(7-8), 495-504.
- Horcajadas, A., Jouma, M., Román, A., Jorques, A., & Cordero, N. (2015). Costos del tratamiento endovascular frente al quirúrgico en hemorragia subaracnoidea aneurismática. *Neurocirugía*, 26(1), 13-22.
- Iqbal, S., Hayman, E., Hong, C., Stokum, J., Kurland, D., Gerzanich, V., & Simard, J. (2016). Inducible nitric oxide synthase (NOS-2) in subarachnoid hemorrhage: Regulatory mechanisms and therapeutic implications. *Brain Circ*, 2(1), 8-19.
- Jedrzejska-Szypulka, H., Larysz-Brysz, M., Kukla, M., Snietura, M., & Lewin-Kowalik, J. (2009). Neutralization of interleukin-1beta reduces vasospasm and alters cerebral blood vessel density following experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Curr Neurovasc Res*, 6(2), 95-103.
- Jung, C., Lange, B., Zimmermann, M., & Seifert, V. (2013). CSF and Serum Biomarkers Focusing on Cerebral Vasospasm and Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke Res Treat*.
- Junior, J., Welling, L., Schafranski, M., Yeng, L., do Prado, R., & Figueiredo, E. (2017). Prognostic model for patients with traumatic brain injuries and abnormal computed tomography scans. *J Clin Neurosci*, 16(31103-1), 1-7.
- Kazakevich, Y., & Lobrutto, R. (2007). *HPLC for pharmaceutical scientist*. New Jersey: Wiley.
- Kazamata, K., Kamiyama, H., & Ishikawa, T. (2006). Reference table predicting the outcome of subarachnoid hemorrhage in the elderly, stratified by age. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 15(1), 14-17.
- Kofler, M., Schiefecker, A., Ferger, B., Beer, R., Sohm, F., & Helbok, R. (2015). Cerebral Taurine Levels are Associated with Brain Edema and Delayed Cerebral Infarction in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocrit Care*, 23(3), 321-9.
- Koga, Y., Povalko, N., Nishioka, J., Katayama, K., Kakimoto, N., & Matsuishi, T. (2010). MELAS and L-arginine therapy: pathophysiology of stroke-like episodes. *Ann N Y Acad Sci*, 1201, 104-10.
- Kostulas, N., Pelidou, S. H., Kivisäkk, P., Kostulas, V., & Link, H. (1999). Increased IL-1beta, IL-8, and IL-17 mRNA expression in blood mononuclear cells observed in a prospective ischemic stroke study. *Stroke*, 30(10), 2174-9.

- Krajewski, W., Collins, R., Holmberg-Schiavone, L., Jones, T., Karlberg, T., & Mowbray, S. (2008). Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design. *J Mol Biol*, 375(1), 217-28.
- Lai, T., Zhang, S., & Wang, Y. (2014). Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol*, 115, 157-88.
- Lantigua, H., Ortega-Gutierrez, S., Schmidht, J., Lee, K., Badjatia, N., Agarwal, S., & Mayer, S. (2015). Subarachnoid hemorrhage: who dies, and why? *Crit Care*, 19(1), 309.
- Liu, M., Zhou, K., Li, H., Dong, X., & Tan, G. (2015). Potential of serum metabolites for diagnosing post-stroke cognitive impairment. *Mol Bio Syst*, 11, 3287-96.
- Lock, E., & Bonventre, J. (2008). Biomarkers in translation; past, present and future. *Toxicology*, 245(3), 163-6.
- Luengo-Fernandez, R., Gray, A. M., & Rothwell, P. M. (2012). Effect of urgent treatment for transient ischemic attack and minor stroke disability and hospital costs (EXPRESS study): a prospective population-based sequential comparison. *Lancet Neurol*, 8, 235-43.
- Malaver Ortega, L. F., Alméciga-Díaz, C. J., Morales Monsalve, I. S., Echeverría Peña, O., Guevara Morales, J., & Barrera Avellaneda, L. (2009). Cuantificación de aminoácidos en plasma empleando cromatografía líquida de alta eficiencia. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 43(4), 647-60.
- Mendioroz-Iriarte, M., Cuadrado-Godia, E., & Montaner-Villalonga, J. (2009). Biomarcadores plasmáticos en la enfermedad vascular cerebral isquémica. *Hipertens riesgo vasc*, 26(6), 266-274.
- Molnar-Perl, I. (2001). Derivatization and chromatographic behavior of the o-phthaldialdehyde amino acid derivatives obtained with various SH-group-containing additives. *J Chromatogr A*, 913(1-2), 283-302.
- Molnar-Perl, I. (2011). Advancement in the derivatizations of the amino groups with the o-phthaldehyde-thiol and with the 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride reagents. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879(17-18), 1241-69.
- Muñana-Rodríguez, J., & Ramírez-Elías, A. (2014). Escala de coma de Glasgow: origen, análisis y uso apropiado. *Enfermería Universitaria*, 11(1), 24-35.
- Naidech, A. M., Janjua, N., Kreiter, K. T., Ostapkovich, N. D., Fitzsimmons, B. F., & Mayer, S. A. (2005). Predictors and impact of aneurysm rebleeding after subarachnoid hemorrhage. *Arch Neurol*, 62(3), 410-6.
- Naini, A., Kaufmann, P., & Shanske, S. (2005). Hypocitrullinemia in patients with MELAS: an insight into the "MELAS paradox". *J. Neurol. Sci.*, 229, 187-193.
- Owens, W. B. (2011). Blood pressure control in acute cerebrovascular disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 13(3), 205-11.
- Pasantes, H., Tuz, K., & Ordaz, B. (2002). Edema cerebral: mecanismos celulares de control. *Mensaje Bioquímico*, 26, 163-75.
- Pendyala, G., Trauger, S. A., Kalisiak, E., Ellis, R. J., Siuzdak, G., & Fox, H. S. (2009). Cerebrospinal fluid proteomics reveals potential pathogenic changes in the brains of SIV-infected monkeys. *J Proteome Res*, 8(5), 2253-60.
- Pérez-Neri, I. (2015). Casi todo sobre el óxido nítrico. *Arch Neurocién*, 20(4), 271-80.
- Perucho, J., Gonzalo-Gobernado, R., Bazan, E., Casarejos, M., Jiménez-Escriq, A., Asensio, M., & Herranz, A. (2015). Optimal excitation and emission wavelengths to analyze amino acids and optimize neurotransmitters quantification using precolumn OPA-derivatization by HPLC. *Amino Acids*, 47(5), 963-73.
- Petzold, G., Haack, S., von Bohlen Und Halbach, O., Priller, J., Lehmann, T., Heinemann, U., & Dreier, J. (2008). Nitric oxide modulates spreading depolarization threshold in the human and rodent cortex. *Stroke*, 39(4), 1292-9.

- Pluta, R. (2008). Dysfunction of nitric oxide synthases as a cause and therapeutic target in delayed cerebral vasospasm after SAH. *Acta Neurochir Suppl*, 104, 139-47.
- Puntmann, V. O. (2009). How-to guide on biomarkers: biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease. *Postgrad Med J*, 85(1008), 538-45.
- Qureshi, M. I., Vorkas, P. A., Coupland, A. P., Jenkins, I., Harri, & Davies, A. H. (2016). Lessons from Metabonomics on the Neurobiology of Stroke. *Neuroscientist*, 23(4), 374-82.
- Rallidis, L. S., Demosthenes, M. V., Vikelis, M., Panagiotakos, D. B., Rizos, I., & Zolindaki, M. G. (2006). Inflammatory markers and in-hospital mortality in acute ischaemic stroke. *Atherosclerosis*, 189(1), 193-7.
- Rodríguez, P. L., y Rodríguez García, D. (2011). Hemorragia subaracnoidea: epidemiología, etiología, fisiopatología y diagnóstico. *Rev Cubana Neurol Neurocir*, 1(1), 59-73.
- Rothwell, P. M., Giles, M. F., Chandratheva, A., Marquardt, L., Geraghty, O., Redgrave, J. N., & Lovelock, C. E. (2009). Effect of urgent treatment for transient ischaemic attack and minor stroke on disability and hospital costs (EXPRESS study): a prospective population-based sequential comparison. *Lancet Neurol*, 8(3), 235-43.
- Rumalla, K., & Mittal, M. K. (2016). Acute Renal Failure in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Nationwide Analysis. *World Neurosurg*, 1-6.
- Sahu, S., Nag, D. S., Swain, A., & Samaddar, D. P. (2017). Biochemical changes in the injured brain. *World J Biol Chem*, 8(1), 21-31.
- Samuelsson, C., Hillered, L., Zetterling, M., Enblad, P., Hesselager, G., & Ronne-Engström, E. (2007). Cerebral glutamine and glutamate levels in relation to compromised energy metabolism: a microdialysis study in subarachnoid hemorrhage patients. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27(7), 1309-17.
- Sehba, F. A., Hou, J., Pluta, R. M., & Zhang, J. H. (2012). The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Prog Neurobiol*, 97(1), 14-37.
- Siegel, G., Alberts, R., Brady, S., & Price, D. (2005). *Basic Neurochemistry*. Chicago: Elsevier.
- Skoog, D., Holler, F., & Nieman, T. (2001). *Principios de análisis instrumental*. McGraw-Hill.
- Starke, R. M., & Connolly, E. S. (2011). Rebleeding after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*, 15(2), 241-6.
- Stefani, M., Modkovski, R., Hansel, G., Zimmer, E., Kopczynski, A., & Portela, L. (2017). Elevated glutamate and lactate predict brain death after severe head trauma. *Ann Clin Transl Neurol*, 4(6), 392-402.
- Tsikis, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 851(1), 51-70.
- Udekwu, P., Kromhout-Schiro, S., Vaslef, S., Baker, C., & Oller, D. (2004). Glasgow Coma Scale score, mortality and functional outcome in head-injured patients. *J Trauma*, 56(5), 1084-9.
- van den Berg, R., Foumani, M., Schröder, R., Peerdeman, S., Horn, J., & Vandertop, P. (2011). Predictors of outcome in World Federation of Neurologic Surgeons grade V aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients. *Crit Care Med*, 39(12), 2722-7.
- van Lieshout, J. H., Fischer, I., Kamp, M. A., Donders, A., & Petridis, A. K. (2017). Subarachnoid Hemorrhage in Germany Between 2010 and 2013: Estimated Incidence Rates Based on a Nationwide Hospital Discharge Registry. *World Neurosurg*, 104, 516-521.
- Vergouwen, M., Ildigwe, D., & McDonald, R. (2011). Cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage contributes to poor outcome by vasospasm-dependent and -independent effects. *Stroke*, 42(4), 924-9.
- Vivancos, J., Gilo, F., Frutos, R., Maestre, J., García-Pastor, A., Quintana, F., & Ximenez-Carrillo, A. (2014). Guía de actuación en la hemorragia subaracnoidea. Sistematizada diagnóstica y tratamiento. *Neurología*, 29(6), 353-370.

- Wagner, M., Jurcoane, A., Hildebrand, C., Güresir E., & Hattingen, E. (2013). Metabolic changes in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage apart from perfusion deficits: neuronal mitochondrial injury? *AJNR Am J Neuroradiol*, *34*(8), 1535-41.
- Weir, J., Steyeberg, E., Butcher, I., Lu, J., Lingsma, H., McHugh, G., & Roozenbeek, B. (2012). Does the extended Glasgow Outcome Scale add value to the conventional Glasgow Outcome Scale? *J Neurotrauma*, *29*(1), 53-8.
- Wilson, J., Pettigrew, L., & Teasdale, G. (1998). Structured interviews for the Glasgow Outcome Scale and the extended Glasgow Outcome Scale: guidelines for their use. *J Neurotrauma*, *15*(8), 573-85.
- Wu, J., Yu, S., Wu, S., & Bao, A. (2016). A sensitive and practical RP-HPLC-FLD for determination of the low neuroactive amino acid levels in body fluids and its application in depression. *Neurosci Lett*, *11*(616), 32-7.
- Yang, Z., Zhang, Z., Li, T., Li, S., & Peng, J. (2014). Up-regulation of brain-enriched miR-107 promotes excitatory neurotoxicity through down-regulation of glutamate transporter-1 expression following ischaemic stroke. *Clin Sci (Lond)*, *127*(12), 679-89.
- Zetterling, M., Hillered, L., Samuelsson, C., & Ronne-Engström, E. (2009). Temporal patterns of interstitial pyruvate and amino acids after subarachnoid haemorrhage are related to the level of consciousness--a clinical microdialysis study. *Acta Neurochir (Wien)*, *151*(7), 771-80.
- Zhao, B., Fan, Y., Xiong, Y., Yin, R., Zheng, K., Li, Z., & Zhong, M. (2016). Aneurysm rebleeding after poor-grade aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Predictors and impact on clinical outcomes. *J Neurol Sci*, *371*, 62-66.
- Zhong, C., Lv, L., Liu, C., Zhao, L., Zhou, M., & Sun, W. (2014). High homocysteine and blood pressure related to poor outcome of acute ischemia stroke in Chinese population. *PLoS One*, *9*(9), e107498.

XV. ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES CON HEMORRAGIA SUBARACNOIDEA



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

Insurgentes Sur 3877
Col. La Fama, C.P. 14269
Mexico, D.F., Tel. 56-06-14-07
www.innn.salud.gob.mx

Ciudad de México, a ____ de _____ del 2017.

Protocolo: **CARACTERIZACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE GLUTAMATO, TAURINA, ARGININA Y CITRULINA COMO BIOMARCADORES DE PRONÓSTICO EN PACIENTES CON HEMORRAGIA SUBARACNOIDEA.**

Antes de participar en el estudio que se le ha propuesto, es importante que esté informado acerca de las características del mismo y que esté de acuerdo con los procedimientos a los que será sometido. **SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO ES COMPLETAMENTE VOLUNTARIA.** Esta investigación está respaldada por el Comité de Ética y de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN).

¿Para qué se efectúa este estudio? Como es de su conocimiento, su paciente ha sufrido de sangrado en la cabeza, descrito en el área médica como hemorragia subaracnoidea, por lo que se requiere de pruebas diagnósticas complementarias que permita informar sobre la evolución de la enfermedad. Este estudio se realizará para caracterizar concentraciones plasmáticas de sustancias químicas presentes en el organismo llamadas “aminoácidos”, los cuales son: glutamato, taurina, arginina y citrulina en pacientes con hemorragia subaracnoidea. Al conocer las concentraciones plasmáticas de dichos aminoácidos, se podrá conocer sobre el estado del paciente y su posible evolución, los cuales le servirá al clínico para establecer un diagnóstico más certero y por ende emitir un mejor tratamiento.

¿En qué consiste el estudio? Se le tomará muestra sanguínea de su brazo (4 mL) en su ingreso al área de Terapia Endovascular, al mismo tiempo y mediante exploración física, se evaluará el nivel de conciencia por medio de la escala de coma Glasgow. Posteriormente, 8 meses después se le localizará mediante llamada telefónica para realizar una pequeña encuesta llamada escala de resultado Glasgow, la cual nos informará sobre su estado cognitivo y motor. La muestra sanguínea del paciente será analizada en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” para cuantificar los niveles de sustancias químicas llamados aminoácidos, los cuales se encuentran presentes en nuestro cuerpo en la regulación de diferentes funciones y que pueden ser indicadores de alguna lesión, así como la cuantificación de nitratos y nitritos que también son sustancias químicas que nos informan sobre el estado patológico del paciente. Todas las muestras de sangre que se le tomen a su paciente serán conservadas en el Departamento de Neuroquímica del Instituto hasta su destrucción al término del estudio.

¿Qué riesgos puede presentar la toma de sangre? La toma de sangre se realiza mediante punción venosa de una vena del brazo, se considera un procedimiento con bajo riesgo, sin embargo, puede sufrir enrojecimiento, ardor en la zona de punción o la formación de moretones, todos estos eventos no son de gravedad y no requieren de algún tratamiento médico especial y se quitan solos.

¿Cómo se utilizará mi muestra? De la muestra de sangre que usted nos done, extraeremos el plasma sanguíneo para cuantificar mediante métodos analíticos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía la cantidad de aminoácidos, así como la cantidad de nitratos y nitritos presentes en el organismo. Estos procedimientos se realizarán en diferentes tiempos tal como se comentó anteriormente.

¿Quiénes pueden participar en el estudio? Todos los pacientes que hayan ingresado al área de emergencia o Terapia Endovascular del INNN dentro de las 24 horas con diagnóstico de hemorragia subaracnoidea, que no hayan tomado medicamento al menos 8 horas antes del evento hemorrágico y pacientes que acepten participar en el estudio mediante la firma del consentimiento informado.

¿Qué beneficios puedo esperar? El conocer las alteraciones en los niveles plasmáticos de las sustancias llamadas aminoácidos como prueba diagnóstica complementaria, le permitirá al médico establecer un mejor diagnóstico, monitoreo de la enfermedad y de esta forma establecer un mejor tratamiento. Los resultados generados por este estudio ampliarán el campo del conocimiento sobre el diagnóstico y monitoreo de la hemorragia subaracnoidea, ya que permitirá caracterizar si la alteración de uno o de todos los aminoácidos mencionados está asociado a la evolución del paciente después de haber sufrido de hemorragia subaracnoidea.

¿Qué efectos indeseables puedo presentar al participar en el estudio? El riesgo es mínimo, únicamente dolor e inflamación en el sitio de punción, tal como se mencionó en la toma de muestra.

¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas sobre el estudio? Si tiene dudas sobre el proyecto de investigación, análisis y manejo de su muestra puede comunicarse con el Dr. Luis Antonio Tristán López al teléfono 56061407, Ext. 2005.

¿Quién pagará el costo del estudio? Los cargos generados por concepto de hospitalización y medicamentos usted los deberá pagar. Las muestras de laboratorio adicionales que se le mencionó, así como todos los procedimientos involucrados para la realización del proyecto se cubrirán por medio de subsidios federales proporcionados por el laboratorio de Neuroquímica del INNN.

¿Puedo negarme a participar en el estudio? La participación es totalmente VOLUNTARIA, por lo que no se encuentra obligado(a) a participar, lo anterior indica que a su paciente no se le negará la atención requerida.

¿Quiénes van a tener información de los datos y estudios que se realizarán? Toda la información será confidencial y estará disponible sólo para los investigadores. Las muestras serán codificadas con una combinación de letras y números para protección de su identidad.

¿Qué realizarán con las muestras biológicas cuando termine el estudio en caso de que aún existan? La sangre total y el plasma existente después del estudio serán destruidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

¿Puedo conocer los resultados del estudio? Una vez que contemos con los resultados, se le hará de su conocimiento, los podrá solicitar y pedir que le sean explicados en cualquier momento.

Al firmar la presente acepto que:

- a) He leído este formato de consentimiento.
- b) He tenido la oportunidad de preguntar sobre mis dudas y éstas me han sido contestadas.
- c) Entiendo que mi participación es voluntaria.
- d) Acepto participar en el estudio y que puedo elegir abandonar en cualquier momento.
- e) Entiendo que recibiré una copia firmada y fechada de este consentimiento

Nombre y firma del voluntario

Nombre y firma del testigo 1

Nombre y firma del testigo 2

Nombre y firma del investigador que obtuvo el consentimiento

C.c.p. Paciente

ANEXO 2

ESCALA DE DESENLACE GLASGOW

Conciencia:

1. ¿Puede la persona obedecer órdenes simples o decir alguna palabra?

Si ____ No ____ (VS)

Nota: cualquiera que demuestre la capacidad de obedecer incluso comandos simples o pronunciar cualquier palabra o comunicarse específicamente de otra manera ya no se considera estar en estado vegetativo. Los movimientos oculares no son evidencia confiable de una capacidad de respuesta significativa. Corroborar con el personal de enfermería y / u otros cuidadores. La confirmación de VS requiere una evaluación completa.

Independencia en el hogar:

2a. ¿La asistencia de otra persona en el hogar es esencial todos los días para algunas actividades?

Si ____ No ____ (VS) (Sino, ve al tópico 3)

Nota: para una respuesta NO, deberían ser capaces de cuidar de sí mismos en su casa durante 24 horas si es necesario, aunque en realidad no necesitan cuidar de sí mismos. La independencia incluye la capacidad de planificar y llevar a cabo las siguientes actividades: lavarse, ponerse ropa limpia sin pautas, preparar alimentos para ellos mismos, atender a quienes llaman y manejar crisis domésticas menores. La persona debería ser capaz de llevar a cabo actividades sin necesidad de indicaciones ni recordatorios, y debería ser capaz de quedarse solo durante la noche.

2b. ¿Necesitan ayuda frecuente de alguien para estar en casa la mayor parte del tiempo?

Si ____ (inferior SD) No ____ (superior SD)

Nota: para una respuesta NO, deberían ser capaces de cuidar de sí mismos en casa hasta ocho horas durante el día si es necesario, aunque no necesitan cuidar de sí mismos.

2c. ¿El paciente era independiente en casa antes de la lesión?

Si ____ No ____

Independencia fuera del hogar:

3a. ¿Puede realizar compras sin asistencia?

Si ____ No ____ (Superior SD)

Nota: esto incluye poder planear qué comprar, cuidar el dinero y comportarse adecuadamente en público. Normalmente no necesitan comprar, pero deben poder hacerlo.

3b. ¿Podían comprar sin asistencia antes?

Si ____ No ____

4a. ¿Puede viajar localmente sin ayuda?

Si ____ No ____ (Superior SD)

Nota: pueden conducir o usar el transporte público para desplazarse. La capacidad de usar un taxi es suficiente, siempre que la persona pueda llamar por teléfono e instruir al conductor.

4b. ¿Podía viajar localmente sin ayuda antes de la lesión?

Si ____ No ____

Trabajo:

5a. ¿Actualmente puede trabajar (cuidar a los demás en casa) a su anterior capacidad?

Si ____ (si sí, ve al 6) No ____

5b. ¿Qué tan restringidos están?

- a. ¿Capacidad de trabajo reducida? A ____ (Superior MD)
b. ¿Puede trabajar solo, en un trabajo no competitivo o actualmente no puede trabajar? B ____ (Bajo MD)

5c. ¿El nivel de restricción representa un cambio con respecto a la situación previa al trauma?

Si ____ No ____

Actividades sociales y de ocio:

6a. ¿Puede retomar sus actividades sociales y de ocio fuera de casa?

Si ____ (si sí, ve al 7) No ____

Nota: no es necesario que hayan reanudado todas sus actividades recreativas anteriores, pero no deben evitarse por discapacidad física o mental. Si han detenido la mayoría de las actividades debido a la pérdida de interés o motivación, esto también se considera una discapacidad.

6b. ¿Cuál es el alcalde de la restricción en sus actividades sociales y de ocio?

- a. Participa un poco menos: al menos la mitad de veces que antes de la lesión A ____ (baja GR)
b. Participa mucho menos: menos de la mitad de las veces. B ____ (alta MD)
c. No participa: rara vez, si es que alguna vez toma parte. C ____ (baja MD)

6c. ¿El grado de restricción en actividades sociales y de ocio fuera de casa representa un cambio en el respeto o pre trauma?

Si ____ No ____

Familia y amigos:

7a. ¿Hubo problemas familiares o de amistad debidas a problemas psicológicos?

Si ____ No ____ (sino, ve al 8)

Nota: los cambios de personalidad típicos postraumáticos son: temperamento rápido, irritabilidad, ansiedad, insensibilidad hacia los demás, cambios de humor, depresión y comportamiento irracional o infantil.

7b. ¿Cuál ha sido el grado de ruptura o tensión?

- a. Ocasional - menos de una semana. A ____ (baja GR)
- b. Frecuente - una vez a la semana o más, pero no tolerable. B ____ (alta MD)
- c. Constante – diario e intolerable. C ____ (baja MD)

7c. ¿El nivel de interrupción o tensión representa un cambio con respecto a la situación previa al trauma?

Si ____ No ____

Nota: si hubo algunos problemas antes de la lesión, pero estos han empeorado notablemente desde la lesión, responda sí a la pregunta.

Regreso a la vida normal:

8a. ¿Hay algún otro problema actual relacionado con la lesión que afecte la vida diaria?

Si ____ (bajo GR) No ____ (alto GR)

Nota: otros problemas típicos informados después de una lesión en la cabeza: dolores de cabeza, mareos, sensibilidad al ruido o la luz, lentitud, fallas de memoria y problemas de concentración.

8b. Si hubo problemas similares antes de la lesión, ¿han empeorado notablemente?

Si ____ No ____

9. ¿Cuál es el factor más importante en el resultado?

- A ____ Efectos de la lesión en la cabeza
- B ____ Efectos de una enfermedad o lesión en otra parte del cuerpo
- C ____ Una mezcla de estos

Nota: las calificaciones extendidas de GOS se muestran junto a las respuestas en el CRF. La calificación general se basa en la categoría de resultado más baja indicada. Las áreas en las que no ha habido cambios con respecto a la situación previa al trauma se ignoran cuando se realiza la calificación general.

1	Muerto	D
2	Estado vegetativo	VS
3	Discapacidad grave menor	SD-
4	Discapacidad grave superior	SD+
5	Discapacidad moderada baja	MD-
6	Discapacidad moderada alta	MD+
7	Recuperación buena baja	GR-
8	Recuperación buena alta	GR+